

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Alteraciones fisiológicas inducidas por Evernia Prunastri
(L.) ACH. al crecer epifíticamente sobre ramas de Quercus
Rotundifolia, Lam.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Isabel Orus Orus

DIRECTOR:

Pilar Estévez López

Madrid, 2015

TP
1983
075

María Isabel Orus Orus



x - 33 - 016152 0

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS INDUCIDAS POR EVERNIA PRUNASTRI (L.)

ACH. AL CRECER EPIFITICAMENTE SOBRE RAMAS
DE QUERCUS ROTUNDIFOLIA, LAM.

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

75/83

© M^a Isabel Orus Orus
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-7937-1983

MARIA ISABEL ORUS ORUS

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS INDUCIDAS POR EVERNIA PRUNASTRI
(L.) ACH. AL CRECER EPIFÍTICAMENTE SOBRE RAMAS DE QUERCUS
ROTUNDIFOLIA, LAM.

Director: M. Pilar Estévez López
Profesor Adjunto de
Fisiología Vegetal.

M. Isabel Orus Orus

Pilar Estévez

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Biología
Universidad Complutense
Madrid
1981



CATEDRA DE FISILOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D^a María Isabel Orus Orus, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense, ha venido realizando trabajos experimentales en nuestra Cátedra a lo largo de los últimos cuatro años, habiendo obtenido considerables resultados experimentales que, según mi criterio, constituyen suficiente cuerpo doctrinal para integrar una Tesis Doctoral.

Madrid, a 30 de noviembre de 1981

Pilar Estévez

Fdo. : María Pilar Estévez
Prof. Adjunto de Fisiología Vegetal

ii

A mis padres, Ramón y Nelia,
con todo mi cariño.

Este trabajo, que se presenta para optar al Grado de Doctor en Biología, ha sido realizado en el Dpto. de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, con la ayuda de una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Universidades e Investigación.

El trabajo se ha llevado a cabo bajo la dirección de la Profa. Dra. M^a Pilar Estévez López, a quien deseo expresar mi más sincero agradecimiento por su inestimable ayuda, como director y amiga, en el desarrollo de esta investigación. Sus palabras de aliento nunca faltaron en los momentos difíciles.

Asimismo quiero agradecer al Director de nuestro departamento, Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba, su interés y sus acertadas sugerencias; a D. Eloy Mateo Sagasta, Catedrático de Fitopatología de la E.T.S.I. Agrónomos, y a la Dra. Carmen Ascaso, Colaborador Científico del Dpto. de Edafología y Biología Vegetal del C.S.I.C., su amable asesoramiento y colaboración; y a D. Claudio Macías, su excelente ayuda técnica.

ABREVIATURAS

CM-celulosa: carboximetil celulosa

DCPIP: 2,6 diclorofenol indofenol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

p-nitrofenil-P: p-nitrofenil fosfato.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. Los Líquenes Epifitos	2
1.1. Ecología	2
1.2. Relaciones con el sustrato	3
1.2.1. Penetración física	3
1.2.2. Nutrición orgánica y mineral	5
1.2.3. Efecto sobre el sustrato	6
1.3. Las sustancias liquénicas	8
1.3.1. Papel fisiológico	8
1.3.2. Las sustancias liquénicas como sustancias alelopáticas	10
2. Fisiología del Forofito	13
2.1. El proceso fotosintético y el destino de los foto- asimilados	13
2.2. La respuesta de la planta ante situaciones de stress	16
2.3. Protección del envejecimiento por hormonas vegeta- les	17
3. Intención del trabajo	19
II. MATERIALES Y METODOS	20
1. Organismos utilizados	21
2. Estimación en campo del efecto provocado por líquenes epifitos	21
3. Técnicas de microscopía	22
3.1. Estudio de la penetración del líquen en el inte- rior del forofito	22

3.1.1. Por microscopía óptica	22
3.1.2. Por microscopía electrónica de transmisión	23
3.1.3. Por microscopía electrónica de scanning ...	23
3.2. Observación de la ultraestructura cloroplástica ..	24
4. Valoración de actividad β -1,4 glucanásica en el talo de	
<u>E. prunastri</u>	25
4.1. Obtención del extracto	25
4.2. Valoración de la actividad enzimática	25
4.3. Medida de la cantidad de CM-celulosa en el medio	
de incubación	26
4.4. Medida de proteínas	26
5. Obtención de sustancias liquénicas	26
5.1. Extracción de las sustancias liquénicas	26
5.2. Aislamiento de las sustancias liquénicas puras ...	27
6. Condiciones de incubación de los esquejes de <u>Q. rotundi</u>	
<u>folia</u>	27
7. Medida de la Reacción de Hill	28
7.1. Obtención de cloroplastos	28
7.2. Ensayos de la actividad fotolítica	29
7.3. Medida de clorofilas	29
8. Valoración por espectrofotometría de absorción atómica	
del contenido en manganeso de los cloroplastos	30
9. Valoración de azúcares reductores y totales	30
9.1. Extracción de azúcares	30
9.2. Determinación cuantitativa	31
10. Medida de la evolución de las reservas de almidón	32
11. Estimación de la salida de azúcares a los medios de	

incubación	33
12. Medida de la respiración foliar	33
13. Valoración del contenido en lípidos	33
14. Estimación del contenido hídrico y del contenido hídrico relativo	34
15. Estudio de la abscisión foliar	34
15.1. Visualización de la zona de abscisión	34
15.2. Estimación de la tendencia a la abscisión	35
16. Valoración de la actividad fosfatasa ácida	35
III. RESULTADOS	37
1. Observaciones en campo del efecto provocado por líquenes epífitos	38
2. Estudio de la penetración del líquen en el interior del forofito	46
3. Localización de actividad β -1-4 glucanasa de <u>Evernia prunastri</u>	60
3.1. Evolución de la actividad en el talo incubado en luz	60
3.2. Evolución de la actividad en el talo incubado en oscuridad	77
3.3. Evolución de la actividad en los medios de incubación de las experiencias realizadas en luz	82
3.4. Evolución de la actividad en los medios de incubación en los ensayos realizadas en oscuridad	82
3.5. Evolución de la cantidad de celulosa en los medios de incubación	87
4. Medidas de la Reacción de Hill en cloroplastos aislados	

de hojas de <u>Q. rotundifolia</u>	87
4.1. Inhibición de la actividad fotolítica por las sus- tancias liquénicas aisladas de <u>E. prunastri</u>	90
4.2. Efecto inhibidor de cada uno de los cuatro compues- tos por separado	90
4.3. Restauración de la actividad fotolítica por Cl_2Mn . 95	
4.4. Efecto de la adición de hormonas a los medios de incubación	100
5. Contenidos cloroplásticos en manganeso	100
6. Efecto de las sustancias liquénicas sobre los niveles foliares de azúcares reductores y totales. Efecto de la adición de hormonas a los medios de incubación	105
7. Alteraciones del metabolismo del almidón provocadas por la incubación con sustancias liquénicas. Efecto de la adición de hormonas a los medios de incubación	110
7.1. Evolución de las reservas de almidón	110
7.2. Salida de azúcares a los medios de incubación	113
7.3. Respiración foliar	113
8. Niveles de lípidos totales	118
9. Efecto acelerador de la senescencia foliar de las sus- tancias liquénicas. Papel protector de las hormonas ki- netina y ácido giberélico	118
9.1. Contenido en agua y contenido hídrico relativo del tejido foliar	121
9.2. Abscisión foliar	121
9.2.1. Estudio microscópico de la abscisión	126
9.2.2. Estimación de la tendencia a la abscisión .	135

x

9.3. Actividad fosfatasa ácida	138
10. Alteraciones provocadas por las sustancias líquénicas sobre la ultraestructura de los cloroplastos	143
IV. DISCUSION	153
V. CONCLUSIONES	164
VI. BIBLIOGRAFIA	168

I. INTRODUCCION

1. LOS LIQUENES EPIFITOS

1.1. Ecología

Dentro de la extraordinaria asociación simbiótica que representan los líquenes, el grupo de los epifitos epifloédicos incluye una serie de especies que muestran una estrecha dependencia de sustratos arbóreos, en muchas ocasiones, de árboles específicos. De hecho, uno de los puntos de referencia más claros a la hora de definir un líquen es su sustrato. Pero, mientras que en el sentido micológico sustrato y material nutritivo son dos conceptos estrechamente unidos, en Liquenología la cuestión no está tan clara, aunque se acepta que son buenos acumuladores de minerales del sustrato y es evidente que poseen unas preferencias ligadas quizás en algunos casos a su nutrición.

Esta especificidad de sustrato arbóreo se puede relacionar también en algunos casos con características físico-químicas de la corteza como humedad o pH. La textura es importante en ocasiones: En general es más fácil que las esporas queden atrapadas y comiencen su desarrollo en superficies rugosas, como lo demuestran los trabajos de KALGUTKAR & BIRD (1969) y ADAMS & RISSE (1971). También se ha comprobado que son diferentes las comunidades líquénicas que colonizan las zonas lisas y rugosas de un mismo árbol (DEGELIUS, 1964) (BRODO, 1968).

Precisamente a la humedad del sustrato atribuyen algunos autores las diferencias de distribución de algunas comunidades epifíticas. En este sentido merecen citarse los trabajos de LEBLANC (1962) BARKMAN (1958) y KALGUTKAR & BIRD (1969).

Quizás sea el pH del sustrato el más estudiado y controvertido de los factores y, mientras que para algunos autores es la principal causa de distribución de los líquenes, otros no encuentran correlación alguna. Datos a favor de este punto de vista aparecen en los trabajos de HALE (1955) y de FABISZEWSKI (1968); sin embargo, para CULBERSON (1955) no existe tal correlación directa.

1.2. Relaciones con el sustrato

1.2.1. Penetración física: El conocer el alcance de la penetración de los líquenes epífitos en el interior de los sustratos leñosos fue un tema que preocupó a científicos de finales de siglo, quienes trataban de esclarecer su posible papel de parásitos y patógenos de acuerdo con el grado y mecanismo y penetración. La cuestión nunca fue zanjada puesto que mientras que de las observaciones de unos se desprendería que se trataba de una penetración activa con posibles fines nutricios que alcanzaba tejidos vivos, para otros sólo aparecía una penetración superficial que además tenía lugar exclusivamente a través de heridas del tejido y lenticelas, nunca activa ni intracelular. Por ejemplo, PORTER (1917) detectaba a Ramalina a través de la corteza, cortex, floema y cambium cuando en general se aceptaba que los fungos penetraban bastante en la corteza pero quedando confinados a capas de la peridermis. Para BONNIER (1889) las hifas de Trentepohlia llegaban hasta este nivel, perforando las paredes y extrayendo materiales nutritivos del interior de las células. Según LINDAU (1904) la presencia del líquen también estaba limitada a las capas de la peridermis, pero crecía entre ellas, por simple presión, a través de espacios intercelulares y fisuras, nunca rompiendo ni perforando paredes. BRODO (1973) realizó una revisión bastante completa

de este tema, que sólo ha vuelto a ser abordado muy recientemente por ESTEVEZ Y cols. (1980), que encuentran una profunda penetración de las hifas de Evernia prunastri en ramas caídas de Fagus sylvatica en las que es capaz de provocar una gran destrucción de tejidos, incluso del tejido xilemático. También ASCASO Y cols. (1980) han estudiado la penetración del mismo líquen en ramitas vivas de Quercus pyrenaica.

Parece difícil que estos seres, capaces de alterar los materiales más duros, encuentren barreras en el mundo vegetal. En efecto, es de sobra conocido el papel pedogénico de los líquenes saxícolas, que descomponen rocas mediante desintegración biogeofísica (penetración de rizinas, expansión y contracción del talo) y descomposición biogeoquímica (CO_2 , ácido oxálico, quelación) (SYERS & ISKANDAR 1973) y la alteración de materiales tales como vidrio, mármol, alabastro y mosaico (BRIGHTMAN & SEAWARD, 1977). Sin embargo, parece claro que las hojas son una barrera infranqueable, puesto que no se ha llegado a encontrar ningún líquen epifilo cuyas hifas lleguen a penetrar en la epidermis (y sólo dos géneros son capaces de traspasar la cutícula). Los últimos trabajos aparecidos en este sentido son los de MARGOT (1977).

Sin embargo, cuando el sustrato del líquen epifito es un musgo o incluso otro líquen, la invasión de los tejidos del forofito se da frecuentemente, como se describe en el apartado referente al efecto de los líquenes sobre el sustrato.

La penetración de los líquenes en tejidos vegetales depende exclusivamente del micobionte y es probable que la mera presión ejercida por las masas de hifas tenga un importante papel en la ruptura de células y tejidos. Pero no parece factible que sea éste el

Único mecanismo, siendo como es el micobionte perteneciente al grupo taxonómico de los hongos. En este grupo de organismos, parásitos o saprófitos obligados, la invasión de sus huéspedes depende fundamentalmente del ataque bioquímico, y el éxito de la infección está en gran parte determinado por la posesión de la batería de enzimas necesaria para degradar las paredes celulares de sus huéspedes. Sería pues lógico esperar que los líquenes epífitos poseyeran mecanismos similares. Aunque no se han realizado estudios concretos a este respecto, MOISEEVA (1961) señala la extensa producción de enzimas extracelulares por parte del líquen en las zonas del talo en contacto más estrecho con el sustrato.

1.2.2. Nutrición orgánica y mineral: Este sería quizás uno de los aspectos fundamentales a la hora de definir las relaciones entre líquen y sustrato. Se sospecha que muchos líquenes epífitos puedan vivir en una especie de semiparasitismo, ya que el gran alcance de la penetración, que en ocasiones alcanza tejidos vivos, hace pensar en una posible absorción y utilización de los materiales encontrados (BRODO, 1973). Aunque no existen trabajos concluyentes al respecto, SRIVASTAVA (1964) señala que muchos azúcares y otros carbohidratos del líquen son los mismos componentes que existen en la corteza, pudiendo representar un complemento a su nutrición fotosintética. Además concuerda esto con el hecho de que en cultivos in vitro el líquen es capaz de utilizar una amplia gama de carbono y nitrógeno orgánicos (SMITH 1962), y hay que tener en cuenta que los líquenes cuyo ficobionte cloroficea son incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico necesario para la proteogénesis.

En cuanto a los minerales, está sobradamente reconocido

que los líquenes y su distribución se ven muy afectados por los factores químicos del sustrato y que son eficientes acumuladores de los mismos. Pruebas concluyentes sobre la captación de iones minerales por líquenes saxícolas fueron aportadas por SCHATZ (1963), quien mostró cómo el pH de una mezcla de talos liquénicos triturados con polvo de roca y mica era siempre superior al pH - del liquen solo, indicando esto la neutralización con cationes - minerales de los grupos carboxilo e hidroxilo que confieren carácter ácido a los compuestos liquénicos.

En cuanto a los líquenes epifloédicos existe una abundante literatura sobre la correlación entre contenidos minerales de los talos y de sus sustratos, según fue revisado en 1973 por - TUOMINEN & JAAKKOLA. Mas recientemente ha aparecido otro trabajo de SOLBERG (1979) realizado con Alectoria fremonti y Pinus sylvestris, que coincide en líneas generales con las observaciones anteriores: para la mayoría de los elementos existe una estrecha relación entre el contenido del epifito y el del forofito.

También existen pruebas en contra de la captación de cationes del sustrato, como el experimento realizado por TROTET (1969), quien mantenía líquenes creciendo sobre ramas vivas y muertas a las que suministraba fósforo radioactivo y no observaba acumulación significativa de radioactividad en los talos.

1.2.3. Efecto sobre el sustrato: Más arriba se ha hecho - una exposición de la relación epifito-forofito desde el punto de vista del epifito, esto es, influencia ejercida por el forofito y posibles beneficios que la relación comporta para el líquen. Vamos a analizar ahora el otro aspecto: el efecto que el primero puede ejercer sobre el segundo.

Es evidente que los líquenes epífitos alteran el sustrato sobre el que viven, aunque el tema de que hasta que punto esto supone un parasitismo está sin esclarecer. Por una parte no está suficientemente demostrado el beneficio nutricional que la relación comporta al líquen y por otra los efectos negativos que sufre el forofito están poco documentados. El conocimiento popular dice que los líquenes son nocivos para los árboles y de ahí que los campesinos acostumbren arrancarlos de frutales y de encinas. De hecho, en entornos naturales es fácil observar que los árboles jóvenes, y sobre todo, los arbustos que albergan una densa población liquénica muestran frecuentemente signos de falta de vitalidad y defoliación. Pero los únicos casos citados en la literatura de efectos nocivos provocados por poblaciones liquénicas se refieren a la interferencia en el crecimiento de vástagos de plantas de té (ASAHINA & KUROKAWA, 1952), en cuanto a plantas superiores se refiere, y a diversos casos de parasitismo descrito sobre Briofitas e incluso sobre otros líquenes: Es conocido el pujante desarrollo de Herpotallon sanguineum cuando crece sobre hepáticas de la familia Jungermanniaceae, que acaba destruyendo totalmente. También merece citarse el caso del líquen Pachyascus lapponicus que crece sobre Andraea - (POELT & HERTEL, 1968) y de las 160 especies de líquenes conocidas en Europa que parasitan otros líquenes y que son capaces de destruir el talo huésped; entre ellos existen parásitos obligados, facultativos, casos de doble parasitismo, especies parásitos obligadas exclusivamente en las etapas juveniles, etc. (RONDON, 1978) (ZEHETLEITNER, 1978).

Otro aspecto del mismo problema sobre el que sí existe -

abundante bibliografía, que se revisa dentro del apartado en que se describen los efectos alelopáticos de las sustancias líquénicas, es la acción inhibidora de germinación y desarrollo de plantas superiores por parte de estos compuestos.

1.3. Las sustancias líquénicas

1.3.1. Papel fisiológico: Al hablar de sustancias líquénicas, lo hacemos según el criterio de VICENTE (1975) que utiliza este nombre para designar exclusivamente a una serie de compuestos - absolutamente específicos de la simbiosis líquénica. Incluyen cuatro tipos de sustancias: dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y - ácidos úsnicos, todos ellos compuestos polifenólicos, de origen común a partir de ácidos carboxílicos policetónicos derivados del ácido acético.

Se ha especulado mucho sobre la posible función de estos compuestos, aunque muchas de las hipótesis carecen de base documentada. Existen sin embargo varias funciones ecofisiológicas principales bien fundamentadas que, si bien ninguna de ellas es aplicable a todas las sustancias líquénicas, todas ellas tienen importancia en el éxito ecológico de determinadas especies en particular, y algunas están relacionadas con la capacidad quelante que presentan estas sustancias.

Por una parte, la abundancia de compuestos líquénicos dentro del talo supone para muchos líquenes un mecanismo de supervivencia. En efecto, el sabor amargo y la toxicidad inherente a los compuestos cíclicos con grupos hidroxilo libres representa en muchos casos una eficaz defensa contra la herbivoría de vertebrados e invertebrados.

Ejercen las sustancias liquénicas un papel de filtro de las radiaciones solares. Este efecto es debido a que generalmente son pigmentadas y suelen depositarse en elevada concentración en la zona cortical del talo, regulando así la intensidad de radiación que llega a las células del ficobionte, el cual generalmente funciona mejor a bajas intensidades luminosas. Además varias sustancias liquénicas son eficaces protectoras de radiaciones ultravioleta. RUNDELL (1978) hace una detallada exposición sobre todos estos aspectos. También es interesante reseñar en este sentido el trabajo de ESTEVEZ y cols. (1977), que demuestra la protección del β -caroteno por parte de la cloroatranorina.

También desempeñan un importante papel en la regulación de procesos metabólicos dependientes de cationes inorgánicos, relacionado con la capacidad quelante a que se ha hecho referencia. Está demostrado (ESTEVEZ & VICENTE, 1976) que la cloroatranorina de Evernia prunastri es capaz de inhibir la reducción de NADP^+ por ferredoxin- NADP^+ -reductasa, así como también el proceso fotolítico (VICENTE & ESTEVEZ, 1976), en cloroplastos de ficobiontes aislados de la misma especie liquénica. De la misma manera está también comprobada su acción sobre la actividad catalasa (VICENTE & cols., 1975). Quizás sea precisamente éste el papel fundamental de las sustancias liquénicas: la regulación de la simbiosis, que parece poder ser controlada por estos compuestos a distintos niveles.

Las sustancias liquénicas contribuyen asimismo a la nutrición mineral del líquen, gracias al mecanismo de quelación, captando cationes inorgánicos de la atmósfera y del sustrato como se ha citado anteriormente. Conviene hacer hincapié en la relación que

ello tiene con la pedogénesis: la descomposición biogeoquímica de las rocas dependiente de la quelación de cationes inorgánicos por parte de sustancias líquénicas ha sido discutida basándose en la aparente baja solubilidad de estos compuestos , pero la presencia de grupos polares y el fuerte efecto antibiótico contrarrestan este punto de vista. Entre otros trabajos sobre el tema, está el de ISKANDAR & SYERS (1971) que ha determinado las solubilidades en agua de diversas sustancias líquénicas y además está el hecho de que los productos de la quelación de metales por sustancias líquénicas son complejos solubles en agua y por tanto fácilmente movilizables. Es preciso mencionar también que existen opiniones en contra de la capacidad quelante de las sustancias líquénicas como la de BROWN (1976) quien, después de realizar extracciones acetónicas de las sustancias líquénicas del talo, observa que los niveles de cationes retenidos por el mismo no disminuyen.

1.3.2. Las sustancias líquénicas como sustancias alelopáticas : La capacidad antibiótica de los ácidos úsnicos fue ampliamente demostrada por BUSTINZA & CABALLERO (1948) y BUSTINZA (1951)

. Se ha comprobado que alrededor del 50% de las especies líquénicas presentan esta capacidad antibiótica lo que concuerda con el tradicional uso medicinal de estos organismos que existía ya en Egipto en el siglo XVII a.C.

Poseen también las sustancias líquénicas un efecto antifúngico ampliamente demostrado, que puede desempeñar un importante papel ecológico en condiciones naturales al inhibir la formación de micorrizas. Esta inhibición de las micorrizas es mayor o menor según las especies y tiene un fuerte impacto sobre el crecimiento de aquellas

plantas superiores en cuyas raíces tiene lugar este mecanismo simbiótico. Este efecto ha sido estudiado por distintos autores, entre ellos BROWN & MIKOLA (1974) que describen una relación directa entre desarrollo de micorrizas - crecimiento de plántulas de Pinus silvestris, que es a su vez inversa respecto a la densidad de Cladonia alpestris.

En cuanto al efecto alelopático que más nos interesa, es decir, efecto directo sobre las plantas superiores, FOLLMAN & NAKAGAWA (1963) muestran que los extractos de Sticta weigeli retrasan la germinación y disminuyen las tasas de crecimiento en guisante; FOLLMAN & PETERS (1966) encuentran una inhibición en el crecimiento de distintas especies vasculares en respuesta a tratamientos con diversas sustancias líquénicas, siendo las de mayor efecto entre las estudiadas los ácidos girofórico, - úsnico y lecanórico. PYATT (1970) observa una situación similar trabajando en Peltigera canina y diversas gramíneas. Los trabajos posteriores han seguido corroborando estos resultados: inhibición de germinación y desarrollo de granos de trigo por Roccella fucoides (RONDON, 1966), de Polygonum lapathifolium, Silene vulgaris, Festuca rubra, Agrostis stolonifera, Poa trivialis, Agropirum rigidum, Lepidium sativum y Sinapis alba por Evernia prunastri (RAMAUT & THONAR, 1971) y de Triticum sativum y Allium sativum por Letharia vulpina (DAURIAC y RONDON 1.976.)

No hemos querido en esta breve revisión sobre los efectos alelopáticos descritos sobre plantas superiores entrar en la descripción y detalles de los resultados de cada experimento ni tan siquiera hemos recogido todas las experiencias.

En general, los autores se han limitado a constatar, para distintas sustancias liquénicas y especies de plantas vasculares, que existe efecto inhibidor a nivel de germinación y de desarrollo de plántulas por observación del tanto por ciento de germinación, medición de raíces y/o talla de la planta y biomasa. En algún caso, se ha señalado una inhibición de las mitosis en meristemas radiculares, en otros se observaron malformaciones y/o necrosis en zonas apicales de la raíz, coleoptilos o ápices foliares.

Pero en ningún caso del que tengamos conocimiento, los autores han estudiado el mecanismo de interferencia de los compuestos liquénicos: a qué nivel actúan, qué procesos fisiológicos se han visto alterados y de qué manera se relacionan estas alteraciones con los efectos finales observados.

2. FISIOLOGIA DEL FOROFITO

2.1. El proceso fotosintético y el destino de los fotoasimilados

La síntesis de materia orgánica a partir de precursores inorgánicos es el fenómeno fundamental en el mantenimiento de la vida sobre la tierra, fenómeno que funciona acoplado a una fuente de energía. La casi totalidad de la transformación de energía en la tierra a energía ligada a compuestos químicos de la que dependen todos los seres vivos, tiene lugar por conversión de la energía solar en el proceso de fotosíntesis.

En este proceso, las plantas convierten, mediante dos - complejas series de reacciones, CO_2 y H_2O en materia orgánica y O_2 , manteniendo así al mismo tiempo el equilibrio O_2/CO_2 en la - biosfera.

En una primera serie de reacciones, en la etapa luminosa de la fotosíntesis, la energía de las radiaciones solares es atrapada por los pigmentos fotosintéticos de los fotosistemas PI y PII. Inicialmente, la excitación del fotosistema II supone una cesión de electrones de una clorofila al siguiente intermediario de la cadena de transporte electrónico en que ambos fotosistemas se hallan integrados. El funcionamiento de la cadena requiere la existencia de un donador de electrones, que en plantas superiores es el agua, el cual, en un proceso en el que el ión manganeso juega un papel fundamental, los repone a la molécula del pigmento efector del fotosistema II, a partir del cual procede una serie de transferencias electrónicas - entre los distintos componentes de la cadena de transporte no cíclica que conecta el fotosistema II con el fotosistema I. En esta etapa -

luminosa de la fotosíntesis se consigue energía en forma de ATP y poder reductor en forma NADPH.

En la fase oscura de la fotosíntesis tiene lugar la fijación de CO_2 sobre la Ribulosa 1,5 difosfato, con la aparición de dos triosas fosfato. En las denominadas plantas C_4 , la fijación de CO_2 se realiza sobre fosfoenolpirúvico, formándose en principio compuestos con cuatro átomos de carbono.

A partir de las triosas fosfato, mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas presentes en el estroma del cloroplasto, y que constituyen el ciclo de Calvin, se sintetizan los azúcares producto de la fotosíntesis.

El mantenimiento de la función fotosintética depende estrechamente de la integridad de las estructuras cloroplásticas. Para ser más concretos, la fijación de CO_2 requiere una perfecta integridad del cloroplasto puesto que el suministro de ATP y poder reductor al estroma depende exclusivamente del sistema lamelar y se mantiene, aún en cloroplastos dañados, siempre que la estructura de las lamelas no sea alterada. Citaremos, por tener relación directa con el trabajo de investigación que estamos exponiendo, que una deficiencia en Mn^{2+} produce una notable desorganización de la estructura lamelar (TEICHLER-ZALLEN, 1969), provocando una inhibición del fotosistema II. Al parecer, no sólo es fundamental dentro de la cadena de transporte electrónico, sino que parece jugar un importante papel estructural ya que en condiciones de deficiencia en este catión, los cloroplastos se vuelven sensibles a la luz, pierden su estructura y en condiciones extremas pueden llegar a desintegrarse

Los principales productos de la fijación del CO_2 que se acumulan en luz son la sacarosa y el almidón. La sacarosa se sintetiza fuera del cloroplasto a partir de unidades de gliceroaldehído-3-fosfato procedentes del ciclo de Calvin y es la forma fundamental en que la materia fotosintetizada se distribuye por toda la planta. La sacarosa se mueve por vía apoplástica hasta las células acompañantes de los elementos cribosos a los que pasa a través de plasmodesmos. En la casi totalidad de los vegetales es el azúcar - mayoritariamente translocado en el flujo floemático. El transporte floemático es bidireccional y funciona de acuerdo con unos esquemas establecidos para cada momento. En principio, la regulación de la translocación viene determinada por los requerimientos de los sumideros y la producción en las fuentes, de tal manera que una fuente puede estar suministrando a varios sumideros y un sumidero recibiendo fotoasimilados de varias fuentes. Como norma general, la variaciones en las demandas se reflejarán en variaciones en la producción o en su distribución.

El almidón es la principal sustancia de reserva en la mayoría de las plantas, siendo sintetizado y acumulado en los mismos cloroplastos. En ocasiones se acumula también en órganos especializados, donde se sintetiza a expensas de azúcares translocados desde las hojas.

2.2. La respuesta de la planta ante situaciones de stress

La planta se encuentra ante situaciones de stress desde el momento en que se ve sometida a una situación en que cualquiera de los factores que condicionan su fisiología quedan fuera de los límites aceptables para su normal desenvolvimiento. Las principales clases de stress a que una planta se puede ver expuesta tienen que ver con condiciones ambientales relacionadas con el clima, pero también se dan otros tipos relacionados con competición entre individuos, niveles de agua y minerales en el suelo, y otros, entre los que se incluyen el impacto de productos tóxicos naturales o artificiales.

Ante distintos stresses, determinados individuos son capaces de desarrollar respuestas adaptativas, que pueden implicar desde simples respuestas químicas o bioquímicas directas hasta adaptaciones genéticas hereditarias, pasando por complejos mecanismos hormonales. Si el mecanismo de respuesta es acertado, la planta sobrevivirá pero en caso contrario, o si el stress es demasiado fuerte, el organismo o los órganos afectados resultarán dañados y sucumbirán. A pesar de que no se puede hacer siempre responsable de la caída de las hojas, como en ocasiones se ha pretendido, a la fuerte competencia por nutrientes ejercida por órganos en desarrollo, sí es sin embargo cierto que la escasez de productos fotosintéticos es un factor capaz de determinar el fin de un determinado órgano.

Aún cuando son muy variadas las causas primarias que pueden provocar el decaimiento del vegetal, el órgano/s implicado/s pasa/n siempre por el proceso de senescencia.

En una hoja senescente previo a la abscisión tiene lugar

una recuperación de nutrientes, hacia otras partes de la planta gracias a la activación de enzimas degradativos: ribonucleasas, proteasas, fosfatasa ácida, etc. que transforman ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos de reserva, etc. en moléculas pequeñas fácilmente translocables. También tiene lugar un descenso en fotosíntesis y pérdida de clorofilas.

A nivel ultraestructural en una hoja senescente aparecen una serie de anormalidades en los cloroplastos, que son independientes de la causa que haya provocado el envejecimiento foliar y que se concretan fundamentalmente en disrupción de lamelas tilacoidales y acúmulo de glóbulos osmeofílicos (BUTLER & SIMON, 1971).

El envejecimiento foliar culmina con el fenómeno de abscisión, que en la mayoría de las especies va precedido de la formación de la llamada "zona de abscisión", constituida por una o varias capas de células de pequeño tamaño que se originan por divisiones anticlinales a través del peciolo. En algunas especies sin embargo, esta capa de células se forma ya durante el desarrollo de la hoja.

2.3. Protección del envejecimiento por hormonas vegetales.

El efecto positivo de las citokininas como protectoras de envejecimiento en hojas aisladas o cortes de hojas, es conocido desde hace tiempo y probablemente es resultado de dos acciones diferentes. Por una parte previenen la formación de los enzimas hidrolíticos básicos que intervienen en el proceso degradativo y además son capaces de evitar la salida de nutrientes que acompaña a estos procesos. El efecto protector de la hormona se hace patente por el mantenimiento o, por lo menos, el retraso en la pérdida de

clorofilas, proteínas, fosfatos, ácidos nucleicos, etc., en el caso de hojas separadas de la planta y, en los casos en que el tratamiento se realiza sobre una hoja inserta en la planta, previene además de la abscisión, que tiene lugar en hojas más jóvenes sin que la tratada con la hormona se vea afectada.

El efecto del ácido giberélico es comparable en algunas especies al provocado por las citokininas y por ello se le incluye dentro del grupo de las hormonas protectoras del envejecimiento. Aún cuando su actuación en este sentido es menos conocida, parece ser que en general los efectos provocados por el grupo de las giberelinas están relacionados con la desrepresión de genes y la estimulación de síntesis de RNAs.

También se ha descrito un efecto hormonal protector de la ultraestructura cloroplástica, que se traduce en desaparición de plástoglóbulos y reorganización de lamelas tilacoidales en hojas senescentes (BUTLER & SMITH, observaciones no publicadas) (NAITO & cols. 1981).

En cualquier caso existen experiencias muy contradictorias en aplicaciones a vegetales probablemente debido a las múltiples interacciones de estos compuestos y al desconocimiento sobre sus mecanismos exactos de acción.

3. INTENCION DEL TRABAJO.

El propósito de este trabajo ha sido, tomando como modelo el caso de la relación Quercus rotundifolia-Evernia prunastri, - contribuir al conocimiento de la relación existente entre un líquen epifito fruticoso y su forofito arbóreo.

El estudio se ha enfocado desde el punto de vista de esclarecer el efecto provocado por el líquen sobre el árbol.

A la hora de plantearlo y para escoger los organismos sobre los que se iba a llevar a cabo el estudio nos hemos basado en observaciones realizadas en el encinar de Cedillo de la Torre (Segovia) donde las ramas con una abundante cobertura liquénica, representada en su mayor parte por Evernia prunastri, aparecen total o parcialmente desfoliadas mientras que ramas de los mismos árboles sin esa población epifítica presentan una cobertura foliar normal y aspecto vigoroso. Este fenómeno resulta aún más evidente en los arbustos pequeños en los que una situación de este tipo conlleva la atrofia de la planta.

Así pues, conociendo que en la generalidad de los casos la toxicidad de los líquenes depende de las sustancias liquénicas, en este trabajo se ha tratado de esclarecer en primer lugar si tales compuestos tienen posibilidad de llegar a los tejidos conductores del forofito, estudiando la vía y mecanismo de penetración del epifito en el sustrato. Una vez comprobado este extremo, se ha estudiado el mecanismo de acción de las sustancias liquénicas sobre los parámetros fisiológicos foliares del forofito y su relación con los efectos finales observados en el mismo.

II. MATERIALES Y METODOS

1. ORGANISMOS UTILIZADOS

Por ser el líquen más representativo de las poblaciones epifitas sobre distintas especies de *Quercus* en la zona centro, se ha escogido la especie líquénica *Evernia prunastri*, (L.) Ach.

Quercus rotundifolia, Lam. ha sido utilizado para el estudio de la penetración del líquen in vivo y de los efectos provocados en laboratorio por las sustancias líquénicas del epifito.

2. ESTIMACION EN CAMPO DE LOS EFECTOS PROVOCADOS POR LIQUENES EPI-FITOS

La estimación del evidente efecto desvitalizador provocado por la instalación de densas poblaciones líquénicas sobre las encinas se llevó a cabo mediante un muestreo realizado en el encinar de Cedillo de la Torre (Segovia), basado en los siguientes parámetros;

- número de hojas por ramificación primaria
- número de hojas por ramificación secundaria
- número de ramificaciones secundarias, terciarias y cuaternarias
- volumen ocupado por la ramificación primaria.

Dado que los arbustos jóvenes invadidos por líquenes suelen presentar un grado de atrofia total o muy avanzado, no se les tuvo en cuenta a la hora del estudio estadístico, así como tampoco a aquellas ramas en que la densa cobertura líquénica coincidía con una completa desfoliación.

Así pues se muestreó una población de cincuenta individuos de altura aproximada entre 2,5 y 3,5 metros, escogiendo ramificaciones primarias de longitud entre 1 y 1,30 metros y ramifica-

ciones secundarias (no dependientes de la rama principal escogida) de entre 65 y 95 cm de longitud. En cada caso se obtuvieron los datos antes citados referidos a una ramificación con población epifítica de desarrollo notable (cuya biomasa era después estimada) y a otra ramificación comparable en cuanto a altura sobre el suelo, longitud y diámetro, pero carente de cobertura líquénica o, por lo menos, con una cobertura despreciable.

3. TECNICAS DE MICROSCOPIA

3.1. Estudio de la penetración del líquen en el interior del forofito

3.1.1. Por Microscopía Óptica: Se siguió la técnica puesta a punto por GRAM & JØRGENSEN (1953) para el estudio de hongos parásitos de madera. Las muestras objeto de estudio consistían en fragmentos de ramita de forma prismática correspondientes a la zona de inserción del líquen. Estas muestras eran primeramente sometidas a un pretratamiento con objeto de expulsar el aire de los tejidos, tratamiento que consistía en someterlas a vacío durante algunos minutos en alcohol del 96%. De igual manera se sustituía luego el alcohol de los tejidos por agua, que es el procedimiento idóneo para obtener buenos cortes de madera con microtomo de congelación. Con este aparato se obtenían cortes transversales del tejido en los puntos de inserción del líquen y a distintas distancias de los mismos. El colorante se preparaba disolviendo 250 mg de Verde Rápido y 750 de Safranina en alcohol al 60% y añadiendo después unas gotas de ácido clorhídrico ; las secciones se mantenían en el colorante durante 3 minutos, al cabo de los cuales se procedía a la diferenciación y deshidratación, que tenía lugar mediante tres cambios en al

cohol absoluto de tres minutos cada uno. El montaje de las secciones se realizaba en Sandeural.

3.1.2. Por Microscopía Electrónica de Transmisión: Las muestras para microscopía electrónica de transmisión eran primeramente fijadas en glutaraldehído preparado al 6,5% en tampón Sorensen pH 7,1, dejándolas durante una noche en nevera. Al día siguiente se realizaban varios lavados con el mismo tampón, dejándolas en tampón limpio durante toda la noche. Después se procedía a la fijación con tetróxido de osmio preparado al 1% en tampón durante 6 horas. La deshidratación se realizaba mediante series graduadas de alcohol, de acuerdo con el siguiente esquema: 10 mn en alcohol al 30%, 10mn al 50%, dos pasos de diez minutos al 70%, dos de 15 al 90% y por fin tres pasos de media hora cada uno en alcohol absoluto.

La infiltración en spur se realizaba mediante dos pasos de propileno de 20 mn cada uno, seguidos por tres pasos de mezclas propileno-spur en proporción 3:1, 1:1 y 1:3 de varias horas cada uno. Después se mantenían las muestras durante dos días en spur nuevo en nevera para, tras un nuevo cambio de spur, proceder a su polimerización a 70°C durante 24 horas.

Los cortes de las muestras se realizaron en un ultramicrotomo Reichert Om-U2, obteniéndose secciones perpendiculares y paralelas a las zonas de inserción de los talos liquénicos.

Las secciones se tiñeron con citrato de plomo según el método de REYNOLDS (1963) y se observaron en un microscopio Philips 300.

3.1.3. Por Microscopía Electrónica de Scanning: Las mues-

tras de scanning fueron sombreadas con oro-paladio y observadas en un microscopio electrónico Jeol JSM-50A.

3.2. Observación de la ultraestructura cloroplástica

Los fragmentos de hojas de Quercus rotundifolia cuyos cloroplastos se deseaba observar eran fijados durante 5 horas en glutaraldehído al 3,25% preparado en tampón Sorensen 0,1M pH 7,1 y mantenidos en nevera durante este tiempo. A continuación se procedía a varios lavados en el mismo tampón, dejando las muestras en el último lavado durante toda la noche. Al día siguiente se fijaban durante dos horas en tetróxido de osmio al 1%, procediendo después a nuevos lavados en tampón.

La deshidratación del tejido tenía lugar con series graduadas de acetona de acuerdo con el siguiente esquema: un paso de 15 mn en acetona al 30%, otro igual en acetona al 50% y un tercero de dos horas en acetona al 70%. En este último paso se incorporó acetato de uranilo a saturación. Se continuó luego con dos pasos de 15 minutos cada uno en acetona al 90% y tres pasos en acetona al 100%, dos de ellos de 30 minutos y el tercero de una hora.

La infiltración en spur se realizaba mediante dos pasos de propileno de 20 minutos cada uno, seguidos por tres pasos de mezclas propileno-spur en proporción 3:1. 1:1 y 1:3 de varias horas cada uno. Después se mantenían las muestras durante dos días en spur limpio en nevera para, tras un nuevo cambio de spur, proceder a su polimerización a 70° durante 24 horas.

Los cortes de las muestras polimerizadas se realizaron en un ultramicrotomo Reichert Om-U2, procediendo después a teñir las secciones con citrato de plomo durante 10 mn de acuerdo con el método

do de REYNOLDS (1963). La observación se llevó a cabo en un microscopio electrónico Philips 300.

4. VALORACION DE LA ACTIVIDAD β -1,4 GLUCANASICA EN EL TALO DE E-VERNIAPRUNASTRI

La actividad β -1,4 glucanásica fue medida en extractos de E. prunastri incubado a lo largo de 14 horas, tanto en luz como en oscuridad, a 25°, empleando como medios de incubación agua destilada y carboximetilcelulosa (sal sódica) al 0,1% en agua, pH 6. En todos los casos se valoraba también la actividad excretada al medio de incubación.

4.1. Obtención del extracto

Se obtenía el extracto liquénico mediante maceración en tampón acetato sódico 0,1M, pH 5, seguido de centrifugación a 20.000 xg durante 15mn y filtración por Millipore, manteniendo siempre una temperatura no superior a los 2°C.

También el medio de incubación era filtrado previamente a la valoración de su actividad enzimática.

4.2. Valoración de la actividad enzimática

La actividad de los extractos se valoraba de acuerdo con SKARE y cols. (1975) mediante un viscosímetro Cannon-Fenske, a 37°C utilizando como sustrato de la reacción CM-celulosa al 0,5% en el mismo tampón acetato. La viscosidad de la mezcla de reacción se medía en el momento inicial y al cabo de 2 horas de reacción a 37°C.

El mismo extracto enzimático, inactivado por ebullición, era utilizado en todos los casos como control.

La actividad enzimática se expresaba en unidades de actividad específica, definidas como mg de CM-celulosa hidrolizados x mg proteína⁻¹ x mn⁻¹.

4.3. Medida de la cantidad de CM-celulosa en el medio de incubación

Se valoró también la desaparición de CM-celulosa de los medios de incubación a lo largo del tiempo y con los distintos tratamientos. Estas determinaciones se llevaron también a cabo mediante la utilización del viscosímetro.

Las medidas de viscosidad se obtenían en centistokes y se transformaban, mediante la correspondiente recta patrón preparada al efecto, en mg de CM-celulosa.

4.4. Medida de proteínas

La cantidad de proteínas de los extractos líquénicos y de los medios de incubación se calculaban por el método de LOWRY y cols. (1951), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

5. OBTENCION DE SUSTANCIAS LIQUENICAS

5.1. Extracción de las sustancias líquénicas del talo

Se extraían las sustancias líquénicas del talo de E. prunastri mediante lavados sucesivos con acetona pura, uno de los disolventes orgánicos recomendados por VICENTE (1975b) en el que son solubles las cuatro sustancias líquénicas de esta especie: ácido evérnico, ácido úsnico, atranorina y cloroatranorina. Previamente el talo había sido limpiado de polvo y desecado, pues el agua retenida por el líquen disminuye la capacidad de extracción. La acetona era añadida en cantidades de 20 ml por cada 10 g de talo seco, dejando secar éste entre lavado y lavado. La suma de los sucesivos extractos acetónicos así obtenidos, conteniendo la mezcla de las sustancias líquénicas, se desecaba en rotavapor a 30°C, recogiendo un polvo amarillento.

5.2. Aislamiento de las sustancias líquénicas puras

La separación de la mezcla obtenida como se describe en el apartado anterior se realizaba mediante cromatografía en capa fina, en placas de cristal de 20x20, empleando como adherente silicagel G-60 y como líquido de desarrollo acetona:cloroformo 1:1 (v/v), de acuerdo con el método de SANTESSON (1965). Las aplicaciones contenían 200 µg de muestra disuelta en acetona y las placas se dejaban correr, a 26°C y en oscuridad, hasta 2 cm del borde superior de la placa.

Como reveladores se utilizaron cloruro férrico al 3% en solución alcohólica para las cuatro sustancias líquénicas, p-fenilendiamina al 2% en solución alcohólica para atranorina y cloroatranorina y cloramina T al 5% en alcohol al 80% para el ácido úsnico (VICENTE, 1975b).

Las manchas correspondientes a los cuatro fenoles eran visualizadas en una pantalla de luz ultravioleta, recuperadas, y extraídas del silicagel en acetona, recogiendo después por desecación del disolvente.

Los Rf obtenidos fueron 83 para la Atranorina, 53 para la Cloroatranorina, 14 para el Ácido Usnico y 8 para el Ácido Evernico.

6. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LOS ESQUEJES DE QUERCUS ROTUNDIFOLIA

Los esquejes utilizados a lo largo de todo este trabajo para esclarecer el mecanismo de interferencia del líquen sobre el forofito, han consistido en ramitas jóvenes de Q. rotundifolia seleccionadas con criterios de homogeneidad.

Siempre se escogían ramitas gemelas para ser sometidas a

los distintos tratamientos simultáneos, manteniéndolas a temperatura ambiente y con un fotoperiodo de acuerdo con la época del año.

Los esquejes recién recogidos eran puestos a incubar en CO_3HNa 1mM (los esquejes control) o en un medio conteniendo una concentración de sustancias líquénicas de 14 $\mu\text{g/ml}$ disueltas en el mismo bicarbonato sódico. Las sustancias líquénicas eran añadidas a los medios de incubación en forma de la mezcla obtenida a partir del líquen o cada una de ellas por separado.

Cuando se realizaban incubaciones con ácido giberélico o con kinetina, las hormonas eran añadidas a los medios preparados con sustancias líquénicas en concentración 10^{-4}M .

Todas las determinaciones analíticas y enzimáticas se realizaron, salvo cuando se indica otra cosa, a partir de hojas de esquejes incubados en CO_3HNa 1mM, en CO_3HNa 1mM más sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$), y en este último medio suplementado, bien con kinetina o bien con ácido giberélico.

7. MEDIDA DE LA REACCION DE HILL

7.1. Obtención de cloroplastos

Se modificaron los métodos usuales de acuerdo con la naturaleza del material, hojas de encina, de gran consistencia debido a su textura coriácea. Ante la ineficacia del procedimiento usual de maceración con arena de cuarzo, se recurrió a homogeneizar en un homogeinizador MSE a 14.000 rpm, en cloruro sódico 0,35M con protección de hielo. Después de sucesivas filtraciones a través de 4 y 12 capas de gasa, el extracto obtenido se centrifugó a 1500 xg durante 10mn, con lo que precipitan los cloroplastos. Se resuspendían éstos en ClNa 0,35M y se volvían a centrifugar para eliminar posibles impurezas. Estos trabajos se realizaban con gran rapidez, en cámara fría y en penumbra, para proteger los cloroplastos.

7.2. Ensayos de la actividad fotolítica

Los cloroplastos obtenidos a partir de un gramo de hojas de esquejes control o de los incubados con los distintos tratamientos eran resuspendidos en 20 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9, inactivando a continuación por calor un cierto volumen.

La reacción se midió como descenso de la densidad óptica a 595 nm del 2,6diclorofenol indofenol (DCPIP). Los tubos de reacción contenían, en un volumen de 7 ml, 525 nmoles de fosfato sódico, 69 nmoles de DCPIP y los cloroplastos correspondientes a 100 mg de hojas. En el tubo blanco la suspensión de cloroplastos activos se sustituía por tampón y en el tubo control por cloroplastos inactivados.

Las mezclas eran iluminadas con luz blanca incandescente de una densidad de flujo de $2000 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, midiéndose la reacción cada cinco minutos durante media hora.

Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de actividad específica, definida esta unidad como nmoles de DCPIP reducido $\times \text{mg clorofila}^{-1} \times \text{mn}^{-1}$, mediante la utilización de una recta patrón preparada con cantidades conocidas de DCPIP.

Las valoraciones se llevaban a cabo a lo largo de seis días, valorándose en unas ocasiones el efecto de la mezcla de las sustancias liquénicas y en otras el efecto de cada una de ellas por separado. También se ensayó el efecto conjunto de las sustancias liquénicas y la kinetina y de las sustancias liquénicas y el ácido giberélico.

En determinados ensayos, previamente a la reacción, los cloroplastos eran incubados con Cl_2Mn 0,2 mM durante 10 mn.

7.3. Medida de las clorofilas

En todos los casos se obtuvieron las clorofilas mediante extracción en acetona al 80% durante cuatro horas en oscuridad y en frío. Al cabo de este tiempo se centrifugaba a la velocidad de sedimentación de los cloroplastos, valorando después la densidad óptica del sobrenadante a 649 y 665 nm y calculando la concentración de clorofilas mediante la fórmula de STRAIN y cols. (1971).

8. VALORACION DEL CONTENIDO EN MANGANESO DE LOS CLOROPLASTOS

Para llevar a cabo esta valoración se partía de cloroplastos correspondientes a controles o a tratamientos con sustancias líquénicas, previamente desecados en rotavapor.

Cada muestra contenía 250 mg de cloroplastos en peso seco, que eran sometidos a digestión de la materia orgánica. En primer lugar se dejaban las muestras con 20 ml de ácido nítrico, atacando en frío durante una noche y, al día siguiente, los matraces en que se habían dispuesto los cloroplastos se sometían a digestión, en un baño con protección de arena, a 200°C. Este paso duraba unas 24 horas, hasta que el nítrico estaba casi totalmente evaporado y presentaba color clarito. Después de enfriado, se añadían 2 c.c. de ácido perclórico, pasándolo luego a un baño a 300°C, hasta quedar el volumen reducido a 1 c.c. y presentar aspecto transparente. A continuación el matraz se lavaba con agua hirviendo y se filtraba para eliminar precipitados de sales. Este protocolo corresponde a PETER (1947).

La valoración de los extractos diluidos se realizaba en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 403.

9. VALORACION DE AZUCARES REDUCTORES Y TOTALES

9.1. Extracción de azúcares

Para la valoración de la concentración de azúcares foliares se partía de un gramo de hojas (peso fresco) trituradas y la extracción se llevaba a cabo por ebullición a reflujo en 10 ml de etanol al 80% durante 20 minutos. Esta operación se repetía, cambiando el alcohol, por tres veces consecutivas, y el conjunto de los tres extractos se concentraba en rotavapor a 25°C, haciendo también en el rotavapor la sustitución de la fase alcohólica por fase acuosa, mediante sucesivas adiciones de agua destilada y concentración, hasta que el alcohol quedaba totalmente eliminado. Este extracto acuoso era entonces sometido a cuatro o más lavados con éter etílico en embudo de decantación hasta eliminar los pigmentos presentes en el extracto. El extracto así obtenido se enrasaba a 100 ml y constituía la solución de trabajo.

Esta solución se empleaba también para medir, además de los azúcares reductores, los azúcares totales. Para la valoración de éstos, 5 ml de la solución de trabajo eran sometidos a hidrólisis ácida con 50 µl de ácido clorhídrico 1N durante 30 mn al baño María a 100°C. La reacción de hidrólisis se paraba en un baño de hielo, y un ml de este hidrolizado se utilizaba para medir los azúcares totales del extracto.

9.2. Determinación cuantitativa de azúcares

La valoración cuantitativa de los azúcares presentes en ambas soluciones de trabajo se realizaba aplicando el método colorimétrico descrito por NELSON y SOMOGYI (NELSON, 1944, SOMOGYI, 1945). Son necesarios tres reactivos: el reactivo I, que se prepara disolviendo en agua (800 ml) 12 g de tartrato sódico-potásico, 24 g de CO_3HNa_2 , 16 g de CO_3HNa y 144 g de SO_4H_2 ; el reactivo II que lleva 4 g de SO_4Cu y 36 g de SO_4Na_2 en 200 ml de agua y el reactivo arsenomolibdico que se prepara con 25 g de molibdato amónico,

3 g de arseniato sódico, 21 ml de SO_4H_2 concentrado y 475 ml de H_2O .

En un tubo Folin se disponían 1 ml de la solución de trabajo y 1 ml del reactivo III, preparado en el momento de uso mezclando los reactivo I y II en proporción 4:1 (v/v). Todos los tubos a valorar se calentaban al Baño María a 100°C durante 20 mn, después de los cuales se paraba la reacción en un baño de hielo. Una vez fríos se añadía un mililitro de reactivo arsenomolibdico, agitando la mezcla vigorosamente hasta que el color se mantenía estable. La muestra se enrasaba a 25 ml y se medía a 520 nm frente a un blanco preparado con agua destilada simultáneamente y en las mismas condiciones que el extracto. En todas las determinaciones se preparaban también tubos patrón con una solución conocida de glucosa.

La determinación de azúcares totales se llevó a cabo de la misma manera, partiendo del extracto hidrolizado.

El contenido en azúcares se expresó en μg de azúcares reductores por mg de peso seco, mediante transformación de los valores de densidad óptica obtenido con una recta patrón preparada con cantidades conocidas de glucosa.

10. MEDIDA DE LA EVOLUCION DE LAS RESERVAS DE ALMIDON

Para estimar el contenido en almidón de las hojas se utilizaban los restos de tejido de donde previamente se había eliminado los azúcares reductores. Después de desecados, el almidón se extraía mediante hidrólisis con ácido clorhídrico 1N. (10ml) en ebullición a reflujo durante 20 mn y posterior lavado con agua en las mismas condiciones. El conjunto de los dos extractos, conteniendo los azúcares reductores resultantes de la hidrólisis del polímero, era ajustado a neutralidad y diluido .

La valoración y expresión de los datos obtenidos se realizaba de acuerdo con el mismo esquema descrito en el punto anterior.

11. ESTIMACION DE LA SALIDA DE AZUCARES AL MEDIO DE INCUBACION

Se dispusieron esquejes de encina en un volumen de los distintos medios de incubación igual a 60 ml. Cada día se completaba el volumen perdido por transpiración, tomando después sendas alícuotas de los distintos medios, a partir de las cuales se determinaba la cantidad de azúcares totales excretados por la planta, de acuerdo con el protocolo expresado más arriba.

12. MEDIDA DE LA RESPIRACION FOLIAR

La actividad respiratoria de los tejidos foliares se midió por determinación del consumo de oxígeno en un electrodo Yellow Springs Inc., a partir de 250 mg. de tejido en tampón fosfato 75mM pH 7,2 (FUENTE-BURGUILLO y NICOLAS, 1978). Los ensayos se hacían en oscuridad y a 25°C. Los datos polarográficos obtenidos en el registro, se transformaban en μg de oxígeno consumido de acuerdo con el procedimiento descrito por WINKLER (1965).

Los resultados obtenidos se expresaban como $\mu\text{g O}_2$ consumidos $\times \text{mg peso seco}^{-1} \times \text{hora}^{-1}$.

13. VALORACION DEL CONTENIDO EN LIPIDOS

Para la extracción de lípidos se siguió la técnica recomendada por KATES (1970) para tejidos fotosintéticos: las hojas eran homogeneizadas durante 2,5 minutos en un homogeinizador MSE a 14000 rpm en una mezcla de metanol-cloroformo (2:1 v/v). El homogeneizado se filtraba y el residuo se homogeneizaba de nuevo, añadiendo ahora la mezcla metanol-cloroformo anterior y agua en proporción 2:1 (v/v). Después de filtrar, el residuo se lavaba con la misma mezcla metanol-cloroformo. Los tres sobrenadantes obtenidos se disponían en un embu

do de decantación, añadiendo después cloroformo y agua a partes iguales.

Se dejaban separar las fases, recogiendo los lípidos en la fase clorofórmica. Esta fase era luego diluida con benceno y desecada en un rotavapor.

El contenido en lípidos totales de las hojas se estimaba mediante peso seco del extracto desecado así obtenido tal como describe KATES (1970).

14. ESTIMACION DEL CONTENIDO HIDRICO Y DEL CONTENIDO HIDRICO RELATIVO

La estimación del contenido en agua de los tejidos se hacía a partir de varias réplicas de un gramo de peso fresco cada una, por sustracción de sus respectivos pesos secos obtenidos por desecación en estufa a 60°C durante 24 horas.

El contenido hídrico relativo, parámetro que recomienda BARRS (1968) para estimar el estado fisiológico de los tejidos, se valoró mediante la fórmula

$$\frac{\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}}{\text{Peso turgente} - \text{Peso seco}} \times 100$$

manteniendo el tejido en agua hasta que dejaba de absorberla, y midiendo entonces su peso turgente.

15. ESTUDIO DE LA ABSCISION FOLIAR

15.1. Visualización de la zona de abscisión

El desarrollo de la zona de abscisión en los distintos tratamientos a que eran sometidos los esquejes de encina, se planteó como un estudio estadístico realizado sobre un amplia muestra de hojas.

Todos los días, a lo largo del tiempo de experimentación, se obtenían preparaciones para microscopio óptico, de secciones

longitudinales de peciolo, obtenidas en microtomo de congelación.

15.2. Estimación de la tendencia a la abscisión

La tendencia a la abscisión se estimaba sometiendo al peciolo foliar a una fuerza aplicada verticalmente. Cada día, a lo largo del tiempo de experimentación, se tomaba nota del número de hojas caídas por este procedimiento, para cada uno de los cuatro tratamientos. Las muestras contenían alrededor de 150 hojas por tratamiento.

16. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA ACIDA

Para la valoración de esta actividad enzimática se siguió el método de LEO & SACHER (1970) modificado de acuerdo con el de AHSFORD & JACOBSEN (1974). La obtención del extracto se hacía a partir de 3 gramos de hojas y 30 ml de tampón acetato sódico 0,2M, pH 5,5, EDTA 1mM, que se sometían a homogeneización en un aparato MSE Omnimixer a 14000 rpm con protección de hielo. El homogeneizado se filtraba por gasa, se enrasaba a 30 ml y se centrifugaba a 12000 xg durante 15 minutos. La actividad enzimática se valoraba tanto en el sobrenadante como en el precipitado de la centrifugación, previa resuspensión del mismo en tampón acetato. Como sustrato de la fosfatasa ácida en la reacción, se utilizaba p-nitrofenil-P.

Los tubos de reacción contenían, en un volumen final de 5 ml, tamponado a pH 5,5, 1mmol de acetato sódico, 57,6 μ moles de p-nitrofenil-P y el enzima correspondiente al extracto obtenido a partir de 100 mg de tejido fresco. Los tubos blanco se preparaban de la misma manera, sustituyendo el extracto enzimático por agua.

La reacción tenía lugar en baño de agitación a 40°C durante 10 mn, pasados los cuales se filtraba y se alcalinizaba con

NaOH, gracias a lo cual el p-nitrofenol formado por acción del en zima tomaba color amarillo, midiéndose a 400 nm.

Los datos se transformaron mediante la correspondiente recta patrón preparada con concentraciones conocidas de p-nitrofenol, y los resultados se expresaron en unidades de actividad es pecífica, definiéndose la unidad como $\mu\text{moles de p-nitrofenol formado} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{minuto}^{-1}$.

III. RESULTADOS

1. OBSERVACIONES EN CAMPO DEL EFECTO PROVOCADO POR LIQUENES EPIFITOS.

De las observaciones en campo se deduce que una notable - cantidad de ramas huéspedes de una densa población liquénica se encuentran totalmente desfoliadas, sin que ello pueda atribuirse en - principio a la edad de la rama. Esta consideración se basa en que en muchos casos se trata de ramificaciones bastante jóvenes, incluso con ramas gemelas brotadas a partir del mismo punto de dicotomía que presentan una vitalidad normal. Este efecto es especialmente dramático - en los arbustos jóvenes en los que es raro que la invasión del líquen no coincida con una total atrofia del individuo. (Lámina 1, figuras 1 y 2).

Existen distintos grados de desfoliación, que guardan una cierta relación con la biomasa y la distribución de la población epifítica: por una parte, una mayor biomasa de la población instalada - sobre una rama se corresponde en términos generales con un valor más alto del cociente " n° de hojas de la rama control/ n° de hojas de la rama con líquenes", pero también en ocasiones se encuentra el caso - de ramificaciones dicótomas con poblaciones liquénicas comparables - en que mientras unas han quedado totalmente atrofiadas, otras han continuado un desarrollo más o menos pobre. Por otra parte, el desarrollo de la comunidad epifítica no parece afectar a la vitalidad de la rama cuando la colonización se ha limitado a las zonas de mayor diámetro.

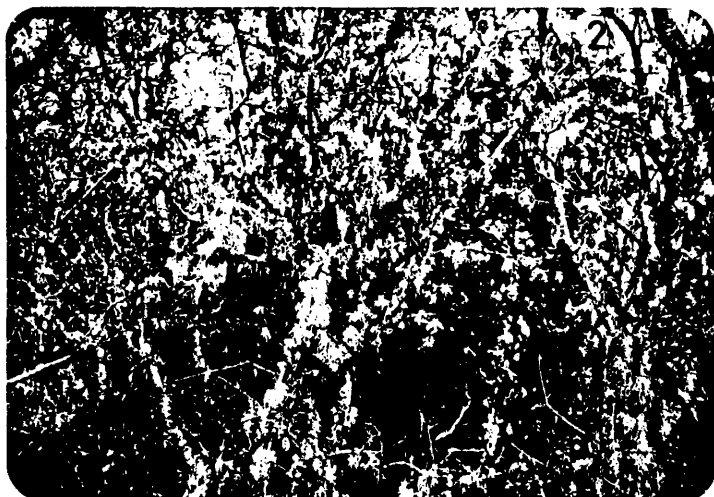
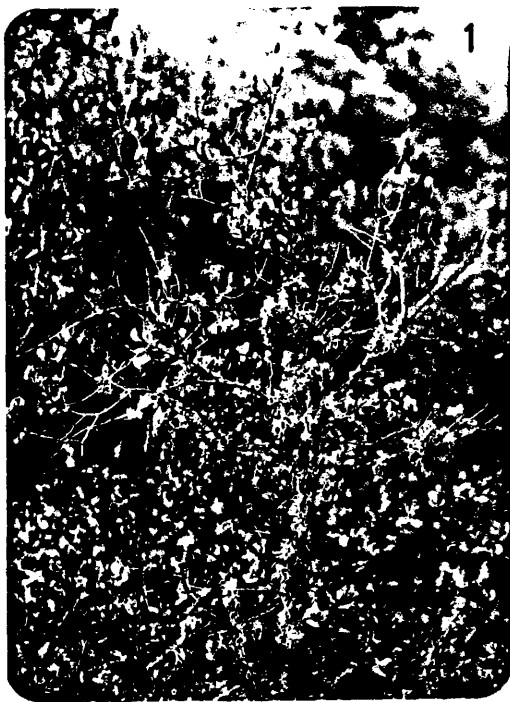
Generalmente, las ramas afectadas suelen conservar las hojas del último año o las más apicales, habiendo perdido todas o gran parte de las demás. (Lámina 2, fig. 1 y 2).

LAMINA 1

Fig. 1 : Joven arbusto de encina, con claros signos de atrofia. Obsérvense los talos líquénicos y las muy escasas ramificaciones que conservan todavía alguna hoja. En general, las ramas están totalmente desnudas.

Fig. 2 : Ramas de ejemplares adultos de Quercus rotundifolia, profusamente cubiertas por talos de Evernia prunastri y totalmente desfoliadas.

40



LAMINA 2

Fig. 1 y 2: Ambas fotografías ilustran la misma situación. Se trata de ramas de ejemplares adultos de Q. rotundifolia con una abundante población epifítica integrada fundamentalmente por E. prunastri, en las que únicamente sobreviven las hojas más = apicales de algunas ramificaciones.

12



Los resultados de la tabla I expresan claramente la influencia de la instalación de los líquenes sobre las ramas de encina. Es evidente la drástica reducción en el número de hojas, que -- para las ramas muestreadas llega a alcanzar proporciones de 1:6 -- respecto de las ramas control. Este efecto es mayor cuanto mayor -- sea la envergadura de la muestra de ramas estudiada: por ejemplo, para las ramificaciones secundarias que se citan en el cuadro, esta misma relación es algo menor (1:4,8). Esta situación se explica por que en el número total de hojas de una ramificación no sólo influye el número de hojas por ramificación subsidiaria sino también el número de éstas que posea y el que todas ellas presenten o no vitalidad. Ya se ha comentado que algunas subramificaciones de ramas invadidas por líquenes se atrofian y, además, en la tabla I se aprecia también que el número de subramificaciones se ve afectado por la presencia de las comunidades liquénicas, siendo mayor este efecto cuanto -- más reciente sea la subramificación considerada.

En efecto, si nos fijamos en la tabla, encontramos que la relación entre ramas sin líquenes-rama con líquenes, es de 1,1:1 para las ramificaciones secundarias, 1,7:1 para las terciarias y 3:1 -- para las cuaternarias lo cual, por otra parte, indica el progresivo decaimiento de la rama afectada.

La estimación del volumen aproximado ocupado por una ramificación concuerda lógicamente, tal como se refleja en la tabla, -- con los datos anteriores: en las ramas con abundante cobertura liquénica, se da una reducción de volumen respecto a las ramas libres de estos epífitos, quedando aquéllas reducidas a entre la mitad o la tercera parte del espacio ocupado por estas últimas.

TABLA I

Comparación de la vitalidad de ramas que albergan una densa población liquénica respecto a ramas carentes de esta vegetación epifítica.

Parámetro	Población liquénica		Relación
	A) NO	B) SI	A/B
Nº hojas por ramificación primaria (1) (de longitud media 1'15 m).	5.776	961	6,01
Nº hojas por ramificación secundaria (de longitud media 0,85 m).	1.626	337	4,82
Nº de ramas secundarias (2) de una ramificación primaria (1).	6,2	5,6	1,10
Nº medio de ramas terciarias (3) a partir de una secundaria (2).	5	3	1,7
Nº medio de ramas cuaternarias a partir de una terciaria (3).	3	1	3
Volumen aproximado (dm ³) ocupado por una ramificación primaria (1).	240	94	2,55

2. ESTUDIO DE LA PENETRACION DEL LIQUEN EN EL INTERIOR DEL FOROFITO.

De acuerdo con los objetivos que se perseguían en el presente trabajo, en el que se trataban de relacionar las sustancias líquénicas de Evernia prunastri con los efectos desvitalizadores que en muchos árboles, y en particular en las encinas, acompañan a las poblaciones epifíticas de esta especie, esta fase de la investigación se enfocó principalmente a la localización de las hifas líquénicas - en el tejido xilemático en general y en sus elementos conductores en particular.

Se hizo una primera aproximación a nivel de microscopía - óptica observando secciones transversales seriales en la inserción - del líquen y zona circundante, lo que permitía seguir su trayectoria en las distintas direcciones. Gracias a la técnica empleada, las hifas se observaban muy bien contrastadas en azul verdoso sobre los tejidos del forofito.

Se comprobó que el pie de fijación del líquen penetra verticalmente en los tejidos corticales, emitiendo al mismo tiempo cuña de masas de hifas concéntricas a la rama, que van desgarrando zonas de la corteza y del floema sin aparente dificultad. En la lámina 3, figura 1, se muestra un ejemplo de cómo las masas de hifas desarrollan cuñas concéntricas que van desgarrando los tejidos de la corteza, al mismo tiempo que profundizan verticalmente en la rama hacia los tejidos vasculares. En la figura 2 de la misma lámina se observa la sección transversal de una cuña de hifas en una zona algo alejada del punto de fijación del talo líquénico.

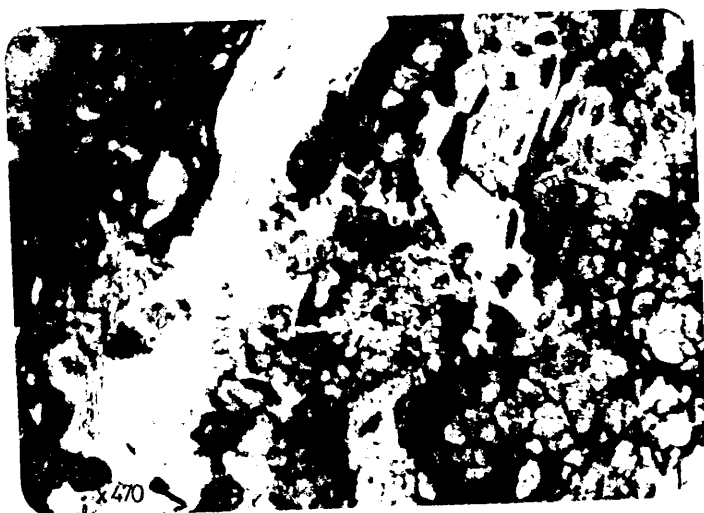
Sin embargo, las masas de hifas no son capaces de progre

LAMINA 3

Fig. 1: Se observa una cuña de hifas (color azul) concéntrica a los tejidos corticales que ha atravesado la peridermis y la empuja hacia el exterior. Una masa de hifas penetra radialmente a través del floema, pasando entre un grupo de esclereidas.

Fig. 2: En esta sección transversal, que corresponde a un corte un poco alejado de la zona de inserción se observa claramente, en la zona central superior de la fotografía, una sección transversal a través de una de las cuñas de hifas emitidas por el pie de fijación del liquen en el sentido longitudinal de la rama.

45



sar hacia el interior del tejido xilemático y parecen detenerse al llegar a este nivel, rodeándolo en ocasiones y separándolo del -- floema. La penetración en este tejido es entonces a nivel de hi-- fas que, aisladamente o en pequeños grupos, se dispersan progre-- sando en vasos, radios medulares, etc. y llegan a invadir en oca-- siones hasta las células de la médula. En la figura 1 de la lámina 4 se ofrece una visión de conjunto de un xilema invadido por hifas, y la figura 2 corresponde a un detalle de un radio xilemático por el que progresan algunas hifas. Las dos figuras de la lámina 5 co-- rresponden a sendos detalles de elementos conductores y células - del xilema con hifas en su interior. En la lámina 6 se ha fotogra-- fiado la misma situación, en el tejido medular de la rama.

Con objeto de obtener una mayor resolución y buscando -- sobre todo el confirmar definitivamente que las hifas encontradas se trataban de hifas líquénicas, se recurrió a la microscopía ---- electrónica.

Al microscopio electrónico de scanning se observan in-- serciones que concuerdan con lo visto al microscopio óptico, es de-- cir, masas de hifas que penetran radialmente en la corteza, con -- desviaciones laterales en distintas direcciones y que al llegar al xilema se ramifican (ver lámina 7). La figura 1 de la lámina 8 --- muestra un corte transversal con una hifa en el interior de un ele-- mento xilemático mientras que la figura 2 de esta lámina y la figu-- ra 1 de la siguiente son cortes longitudinales de elementos xilemá-- ticos con una y dos hifas respectivamente. La figura 2 de la lámi-- na 9 muestra un detalle de la figura 1.

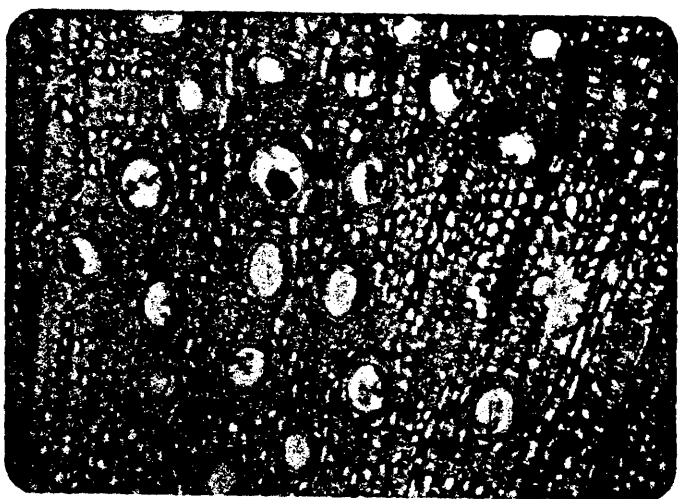
También se realizó el seguimiento de la penetración, al microscopio electrónico de transmisión, habiéndose tomado fotos --

LAMINA 4

Fig. 1: Visión transversal de conjunto de tejido xilemático invadido por hifas, que se detectan tanto en los elementos conductores = como en los radios medulares y demás células.

Fig. 2: Detalle de varias células de un radio medular, visto en sección transversal, en cuyo interior se aprecian sendas hifas.

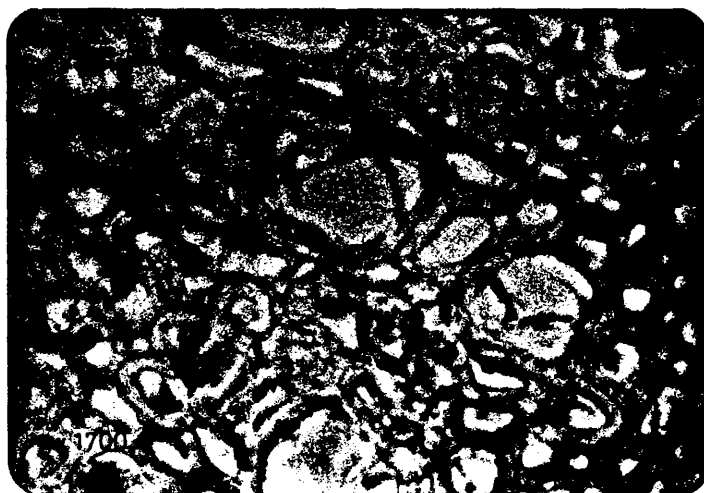
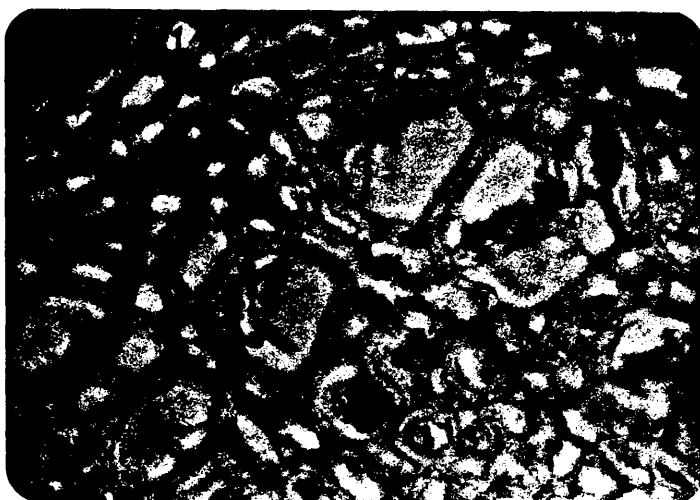
51



LAMINA 5

Fig. 1 y 2: Ambas fotografías muestran en detalle la proliferación de las hifas de Evernia prunastri en el interior de los elementos conductores del xilema del forofito.

53



LAMINA 6

Fig. 1: En esta microfotografía se muestra un corte transversal a través de la zona medular de una ramita de Q. rotundifolia. Obsérvense las típicas células medulares ricas en inclusiones y la gran proliferación de las hifas del epifito que en esta ocasión han llegado a alcanzar el mismo centro de la rama.

55



LAMINA 7

Composición de varias fotografías obtenidas por microscopía electrónica scanning que ilustra la penetración radial de un pie de fijación de E.prunastri. Se observan masas de hifas (señaladas con flechas) hasta llegar a la frontera xilemática, = donde se ramifican, dispersándose.

57

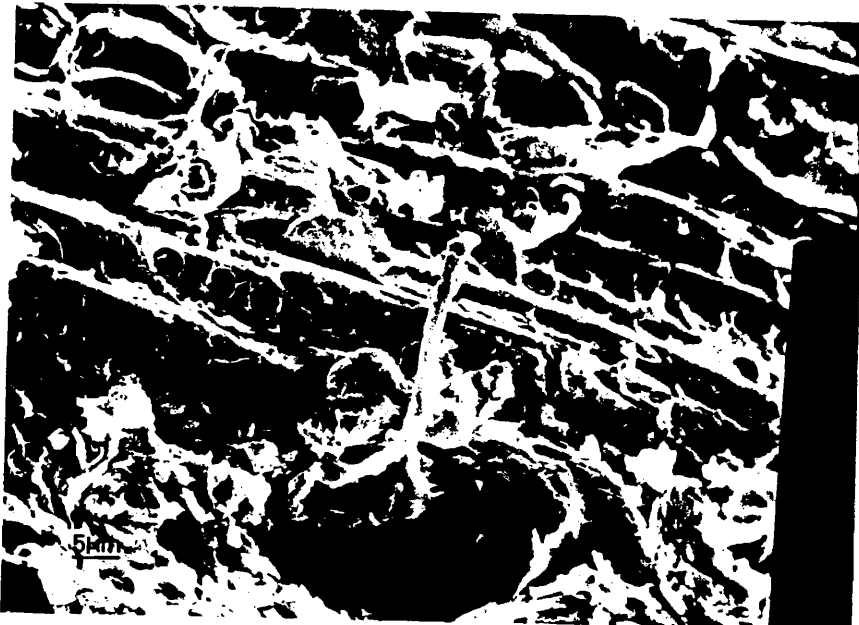


LAMINA 8

Fig. 1: Sección transversal a través de tejido xilemático visualizado por microscopía electrónica scanning. Se observa una hifa en el interior de un elemento xilemático.

Fig. 2: Sección longitudinal a través de tejido xilemático visualizado por microscopía electrónica scanning. Obsérvese una hifa a través del tejido.

59



exclusivamente del tejido xilemático. Los resultados concuerdan con lo anteriormente expuesto, puesto que se localizan hifas aisladas o en pequeños grupos tanto en espacios intercelulares como en vasos conductores, células del parénquima y fibras. En las láminas 10 y 11 se han fotografiado 1, 2, y varias hifas en el interior de células del parénquima xilemático. La figura 1 de la lámina 12 muestra una hifa en un espacio intercelular y en la figura 2 de la misma lámina aparecen hifas en el interior de fibras del xilema. Las láminas 13 y 14 representan cortes transversales de elementos conductores con hifas liquénicas y en la 15 observamos la misma situación en corte longitudinal.

Finalmente, en la lámina 16 se ofrecen dos fotografías que consideramos de gran importancia; se trata de hifas liquénicas rompiendo y atravesando las paredes de células de su forofito y es la demostración palpable de que el líquen posee esta capacidad.

Del exhaustivo estudio que se ha detallado se desprende la capacidad de E. prunastri de penetrar en los tejidos de los forofitos leñosos por cuanto se ha seguido repetidamente su trayectoria a través de los distintos tejidos, sin que pueda existir duda de que se estaban visualizando hifas liquénicas dada la frecuente aparición de cuerpos concéntricos, estructuras exclusivas del estado de simbiosis. (Lámina 10, fig. 2; lámina 11, fig. 1 y 2; lámina 15, fig. 1; lámina 16, fig. 2).

3. LOCALIZACION DE ACTIVIDAD β -1-4 GLUCANASA DE EVERNIA PRUNASTRI.

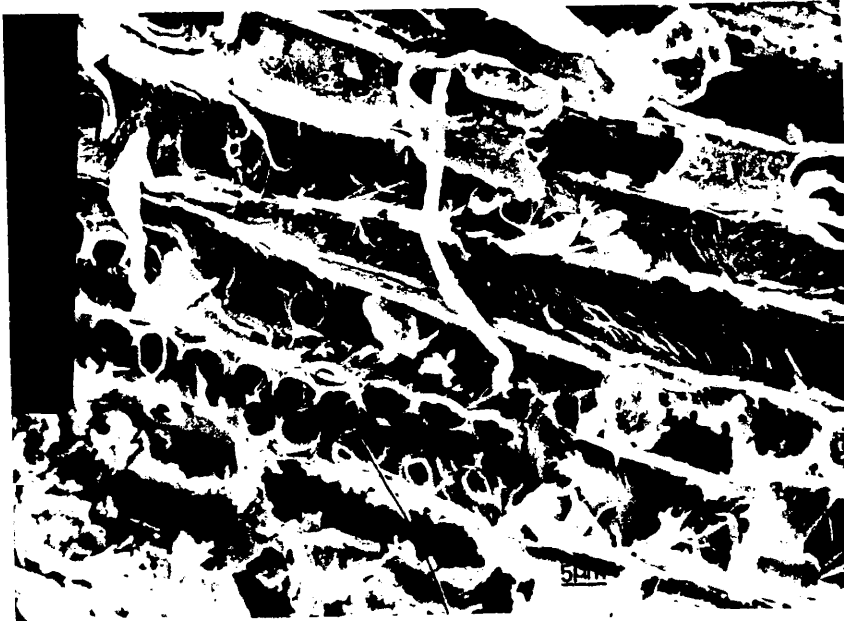
3.1. Evolución de la actividad en el talo incubado en luz.

LAMINA 9

Fig. 1: En este corte longitudinal de una ramita de Q. rotundifolia se observan los típicos = engrosamientos secundarios lignificados y = las punteaduras de los vasos xilemáticos y = dos hifas.

Fig. 2: Se muestra un detalle del extremo apical = de una de las hifas de la figura anterior, = próximo a una punteadura areolada.

6.



LAMINA 10

Fig. 1: Corte transversal de una hifa en el interior de una célula del parénquima xilemático. Se observan plasmodesmos entre las dos células contiguas.

Fig. 2: Se observan dos hifas en sección longitudinal, dentro de células parenquemáticas. En la más grande se pueden apreciar cuerpos con céntricos.

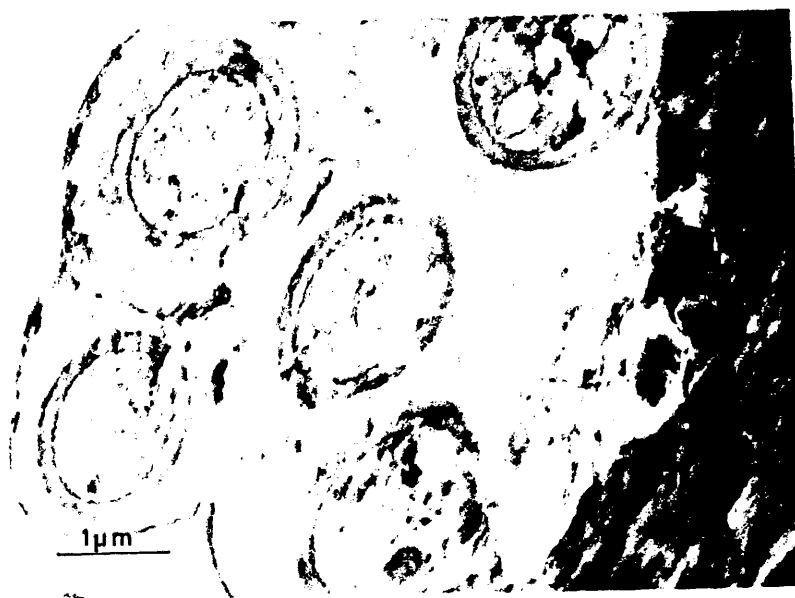
64



LAMINA 11

Fig. 1 y 2: Estas dos fotografías, obtenidas por microscopía electrónica transmisión muestran grupos de hifas en el interior de células del parénquima xilemático. En los dos casos aparecen los cuerpos concéntricos típicos del estado de simbiosis.

66

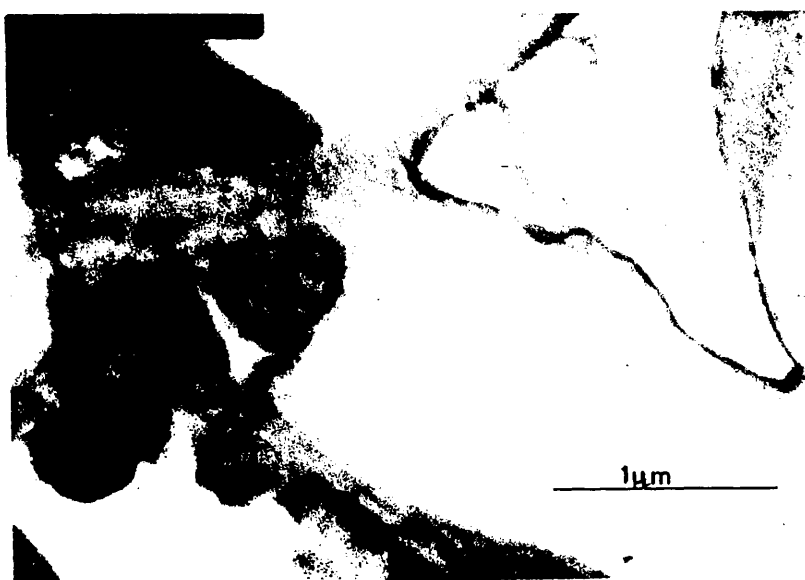


LAMINA 12

Fig. 1: Fotografía tomada al microscopio electrónico de transmisión, en la que se observa una hifa en sección transversal en el interior de un espacio intercelular.

Fig. 2: En esta fotografía aparecen dos hifas en el interior de fibras del xilema.

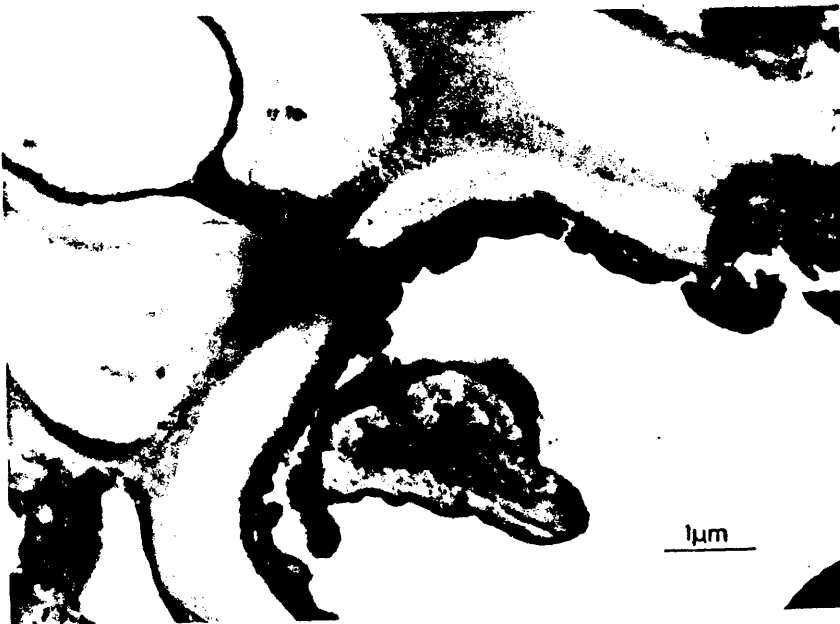
65



LAMINA 13

Fig. 1 y 2: Se trata de dos imágenes obtenidas =
por microscopía electrónica de transmisión=
mostrando cortes transversales de elementos
conductores xilemáticos con hifas en su in-
terior. En la figura 2 la hifa se encuentra
en la proximidad de una punteadura areolada.

90



671

LAMINA 14

Fig. 1 y 2: Imágenes obtenidas por microscopía ==
electrónica de transmisión mostrando cortes=
transversales de vasos xilemáticos con hifas .
en su interior.

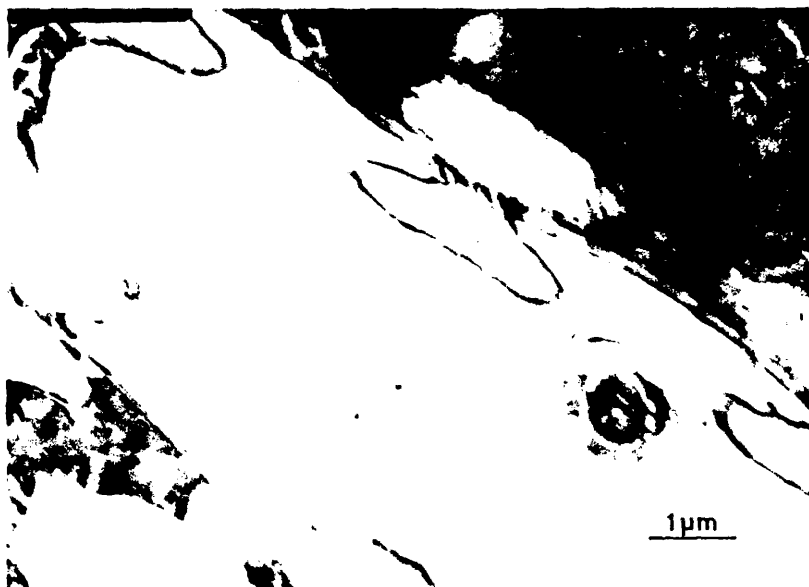


LAMINA 15

Fig. 1: Detalle de una hifa liquénica localizada dentro de un vaso xilemático. Se trata de un corte longitudinal en el que se aprecian muy bien los cuerpos concéntricos.

Fig. 2: Corte longitudinal de un elemento conductor con típicos engrosamientos secundarios , en cuyo interior aparece una hifa.

71

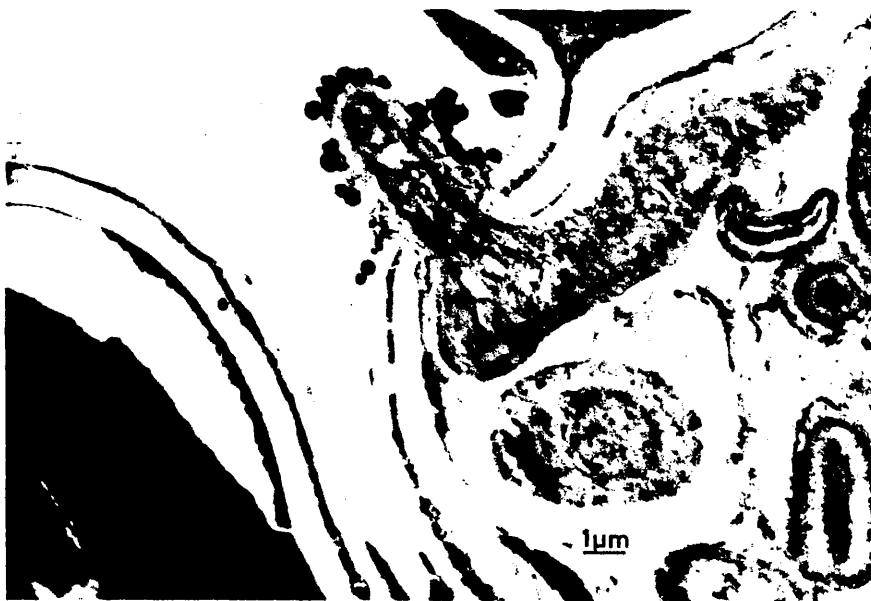


LAMINA 16

Fig. 1: Fotografía tomada por microscopía electrónica de transmisión que muestra un grupo de hifas en el interior de una célula y en la que se aprecia cómo una de ellas ha perforado la pared celular del tejido del huésped.

Fig. 2: Muestra un caso similar, en el que se observa, a más aumentos, una hifa líquénica atravesando una pared celular de la encina. En este caso se distinguen también los cuerpos concéntricos.

75



Al ensayar la actividad β -1-4 glucanásica de E. prunas-
ti se comprueba que el talo posee una actividad basal de escasa -
importancia, que se mantiene constante a lo largo del tiempo de -
experimentación en los talos control incubados en agua destilada.
Los resultados de los ensayos realizados en luz se expresan en la
gráfica nº 1, en la que se aprecia que la actividad de los extrac
tos control oscila alrededor de las 0,04 unidades a lo largo de -
las 14 horas de experimentación.

Cuando la actividad se valora en extractos de talo --
que han sido incubados en presencia de carboximetilcelulosa al -
0,1% en agua destilada, aparece un rápido y drástico aumento de la
actividad a valores muy altos, que a las cuatro horas han alcanza
do su máximo nivel con cerca de 0,3 unidades. A partir de las cua
tro horas la actividad empieza a descender pero se sigue mantenien
do dentro de valores apreciables y relativamente estabilizados en
tre las 8 y 14 horas de tratamiento.

3.2. Evolución de la actividad en el talo incubado en oscuridad.

Las mismas incubaciones realizadas en oscuridad arro
jan unos resultados bastante semejantes a los obtenidos para las
cuatro primeras horas de incubación en luz, pero a partir de ese
momento la evolución difiere significativamente. Los resultados ob
tenidos se expresan en la gráfica nº 2.

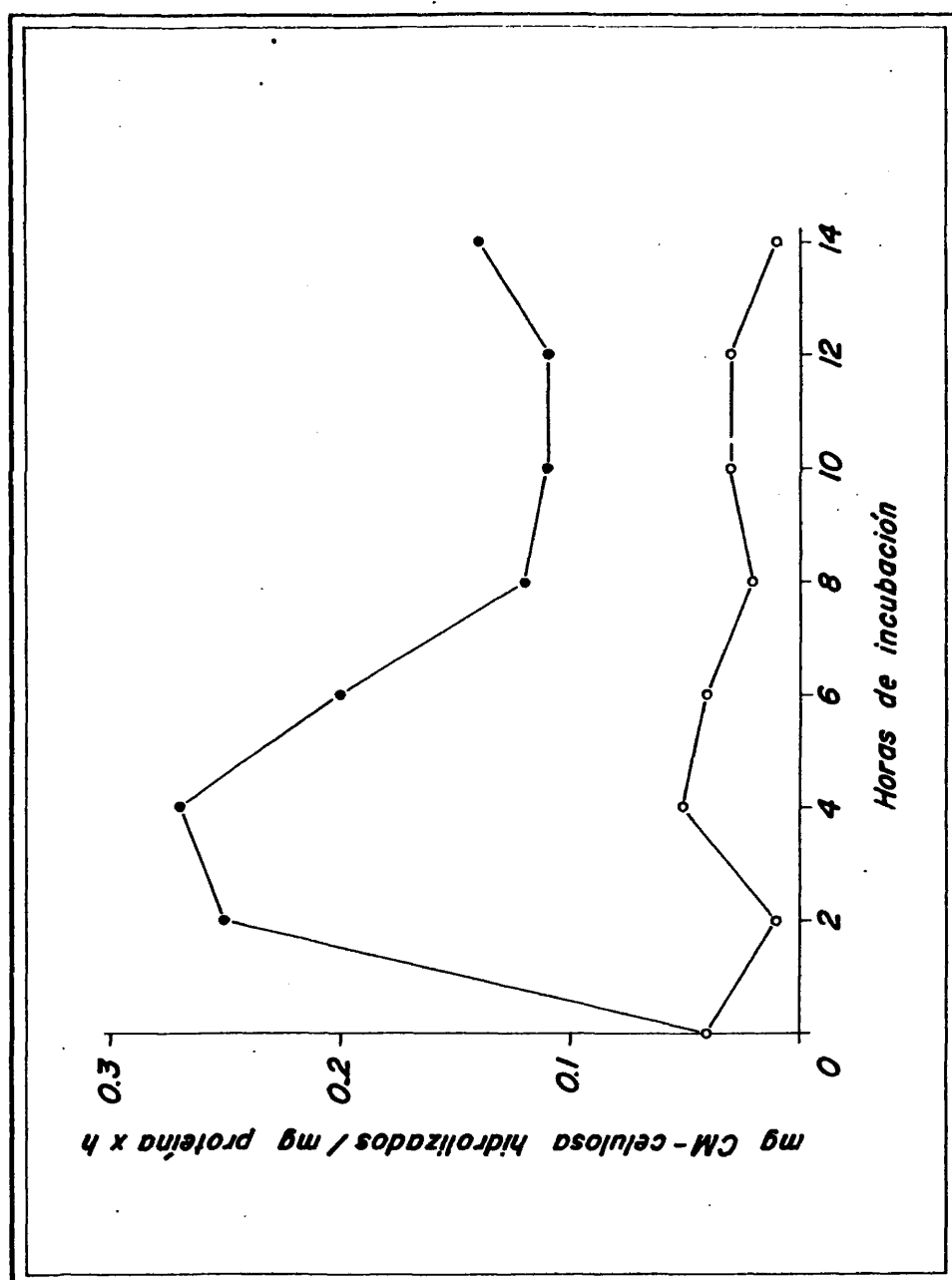
Los extractos obtenidos a partir de talos mantenidos en
agua y oscuridad presentan una actividad equiparable a la de los
controles mantenidos en condiciones de luz: se mantienen, con li
geras oscilaciones, alrededor del valor basal que poseía el talo
en el tiempo 0.

Cuando el líquen se incuba en presencia de CM-celulosa

GRAFICA N° 1

Actividad específica β ,1-4 glucanásica en extractos de E. prunastr
incubado en luz

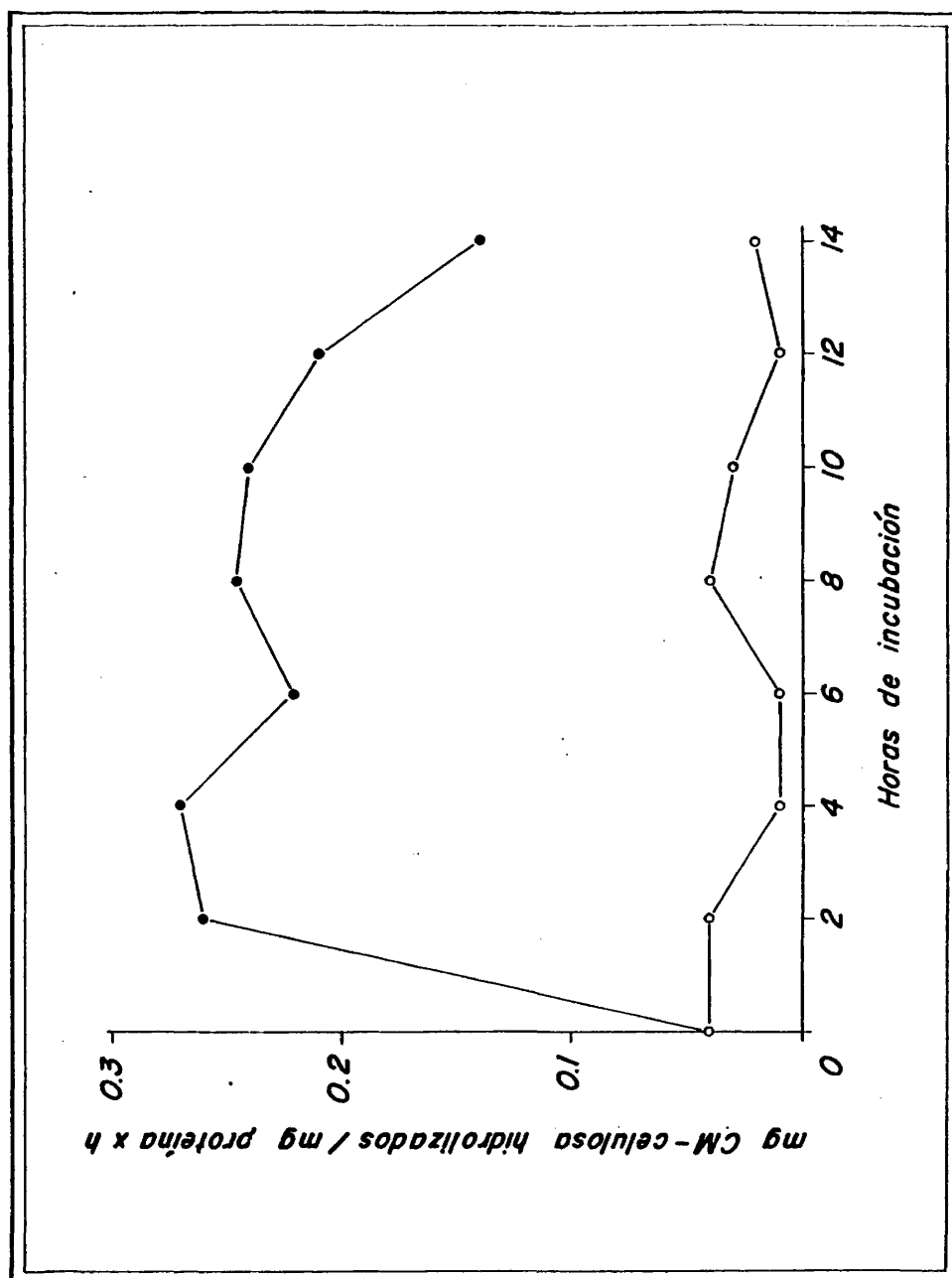
○ ———○ en ausencia CM-celulosa en el medio de incubación
● ———● en presencia CM-celulosa en el medio de incubación



GRAFICA N° 2

Actividad específica β -1,4 glucanásica en extractos de E. prunatri
incubado en oscuridad

○ ———— sin CM-celulosa en el medio de incubación
● ———— con CM-celulosa en el medio de incubación



en oscuridad, al igual que en los ensayos en luz, también la actividad se dispara en las dos primeras horas y alcanza su máximo, que es además del mismo valor, en la cuarta hora. Sin embargo, y a diferencia del ensayo en luz, la actividad enzimática se mantiene dentro de unas cifras de actividad bastante semejantes hasta las 10 horas de experimentación, momento en que empieza a decaer.

3.3. Evolución de la actividad en los medios de incubación de las experiencias realizadas en luz.

Como se observa en la gráfica nº 3, no se detecta en absoluto actividad β -1,4 glucanásica en los medios de incubación de los ensayos realizados sin CM-celulosa, pero sí aparece en cambio cuando el polímero ha sido añadido a los medios.

En la misma gráfica se comprueba que en estas experiencias realizadas en luz, la actividad aparece en el medio de incubación ya dentro de las dos primeras horas y sigue subiendo hasta la sexta hora para descender luego en la décima y mantenerse ya estable dentro de unos niveles inferiores a los máximos pero altos.

3.4. Evolución de la actividad en los medios de incubación en los ensayos realizados en oscuridad.

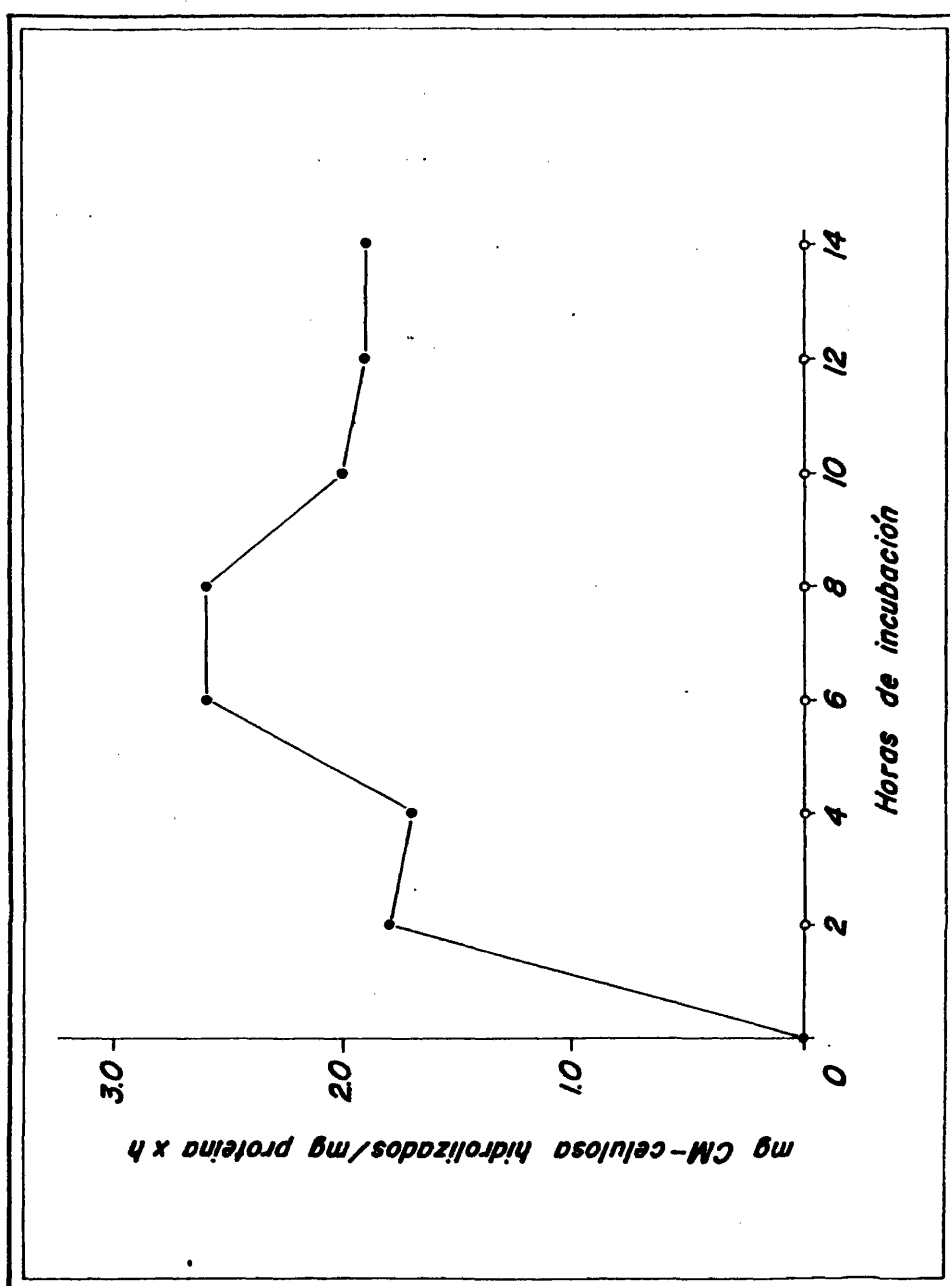
Por lo que se refiere a los medios de incubación de los talos control, y según se puede apreciar en la gráfica nº 4, su comportamiento es el mismo que en el caso de las incubaciones realizadas en luz, es decir, no aparece actividad en ningún momento.

En cuanto a las incubaciones realizadas en oscuridad y con CM-celulosa en el medio, también en la gráfica nº 4, se expresan las actividades medidas en los medios de incubación: Aunque la

GRAFICA N° 3

Actividad específica β -1,4 glucanasa en los medios de incubación
de tratamientos realizados en luz

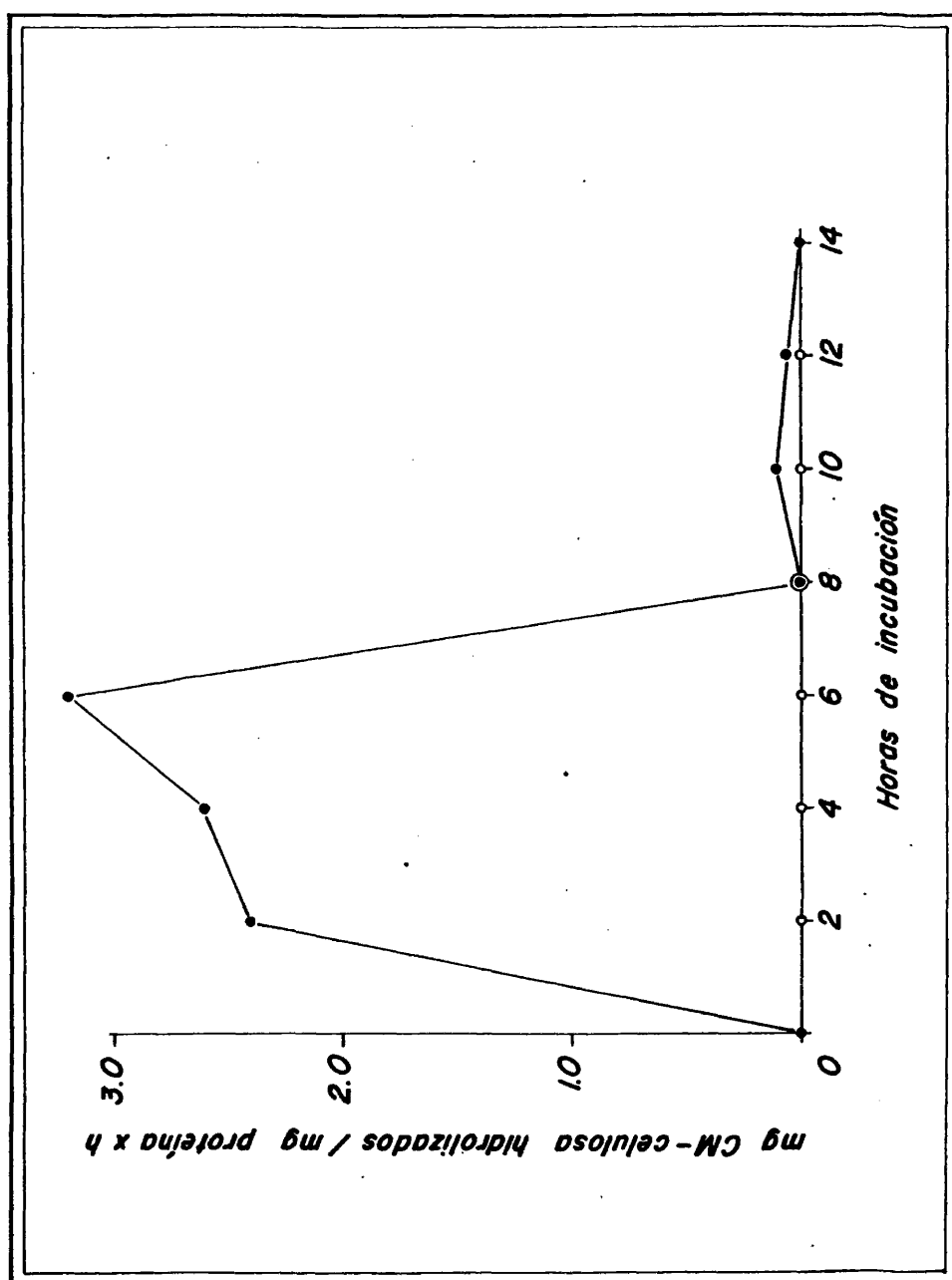
○ ——— ○ en ausencia de CM-celulosa en el medio de incubación
● ——— ● en presencia de CM-celulosa en el medio de incubación



GRAFICA N° 4

Actividad específica β -1,4 glucanasa en los medios de incubación
de tratamientos realizados en oscuridad

O — en ausencia de CM-celulosa en el medio de incubación
● — en presencia de CM-celulosa en el medio de incubación



subida inicial de las 2 horas es más drástica y el máximo de actividad es algo superior al caso de incubaciones en luz, también se alcanza este máximo para las 6 horas de incubación. Sin embargo, cae a continuación bruscamente para mantenerse en unos niveles prácticamente nulos.

3.5. Evolución de la cantidad de celulosa en los medios de incubación.

La cantidad de CM-celulosa en los medios de incubación sigue la evolución descrita en la gráfica nº 5 y es, como se puede observar, en cierto modo concordante con el comportamiento seguido por la actividad enzimática de los medios de incubación. La cantidad del polímero va descendiendo gradualmente hasta las 6 horas de incubación en ambos casos. A partir de entonces sigue descendiendo lentamente en los tratamientos de luz pero se mantiene -- más o menos constante en los de obscuridad.

Como resumen de este punto se podría decir que E. prunastri posee actividad β -1,4 glucanasa, capaz de hidrolizar cadenas de CM-celulosa, que la presencia del polímero provoca un rápido y fuerte desarrollo de la actividad, que los niveles máximos alcanzados son del mismo orden de magnitud en luz y en obscuridad y que, aunque decaen, no desaparecen mientras exista sustrato en el medio. Además es fundamental reseñar que se trata de un enzima excretable y que los niveles de actividad específica en el medio son muy superiores a los que aparecen en el talo.

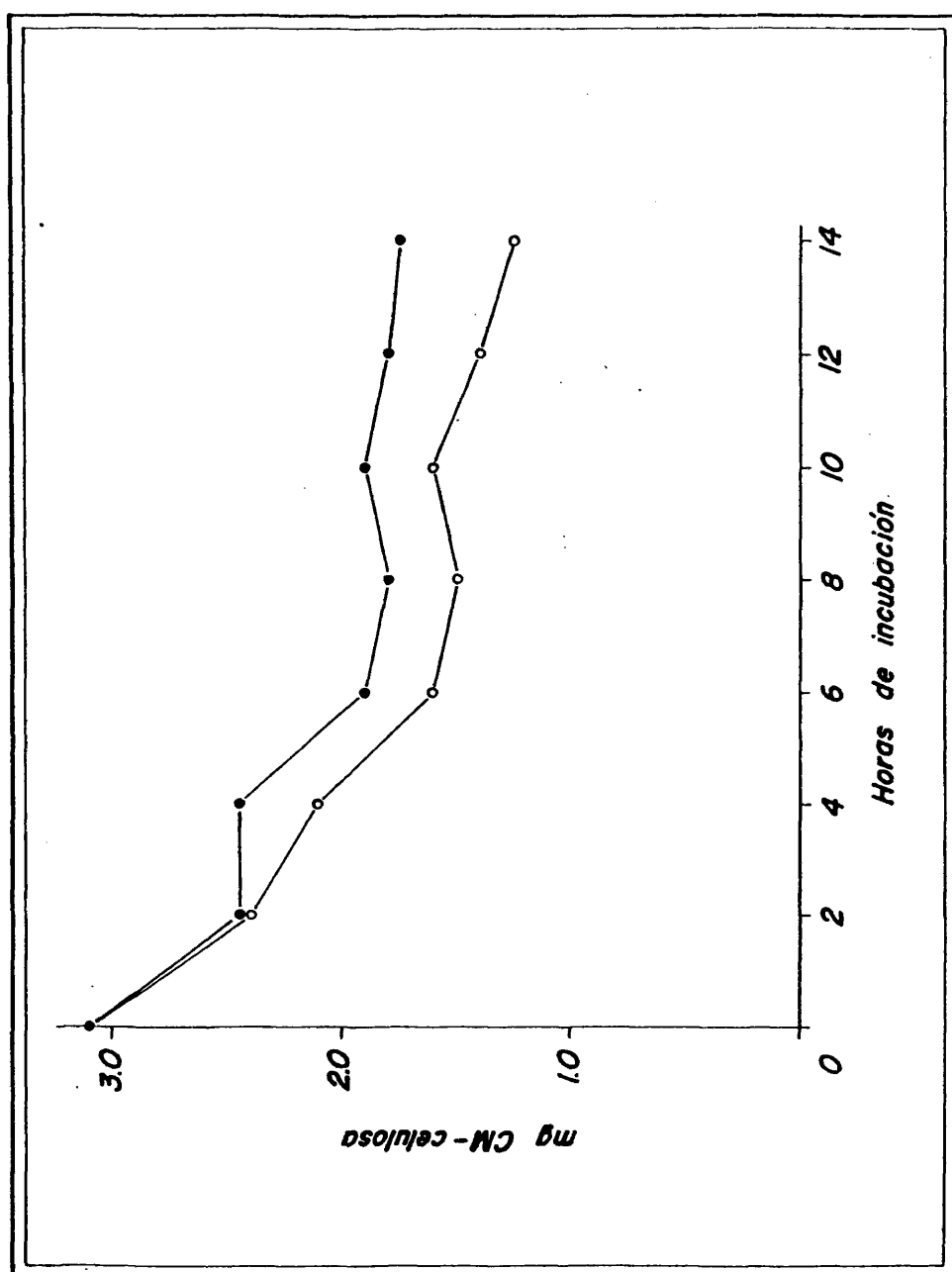
4. MEDIDAS DE LA REACCION DE HILL EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE HOJAS DE Q. ROTUNDIFOLIA.

GRAFICA N° 5

Evolución de la cantidad de celulosa en los medios de incubación

O ——— O incubación realizada en luz

● ——— ● incubación realizada en oscuridad



4.1. Inhibición de la actividad fotolítica por las sustancias líquénicas aisladas de *E. prunastri*.

En la gráfica nº 6 se expresan los resultados obtenidos en la valoración de la actividad fotolítica de cloroplastos aislados a partir de hojas de esquejes de *Q. rotundifolia* mantenidos durante seis días en incubación $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{N}$ 1 mM o en el mismo medio suplementado con la mezcla de las cuatro sustancias líquénicas de *E. prunastri* en concentración de 14 µg/ml.

Como se desprende de la observación de la gráfica, los cloroplastos control mantienen una actividad constante a lo largo de los seis días, mientras que aquéllos procedentes de los esquejes sometidos a tratamiento con sustancias líquénicas ven drásticamente reducida su capacidad fotolítica. Esta pérdida de rendimiento es progresiva a lo largo de los días de experimentación, alcanzando unos niveles dramáticamente bajos.

4.2. Efecto inhibidor de cada uno de los cuatro compuestos por separado.

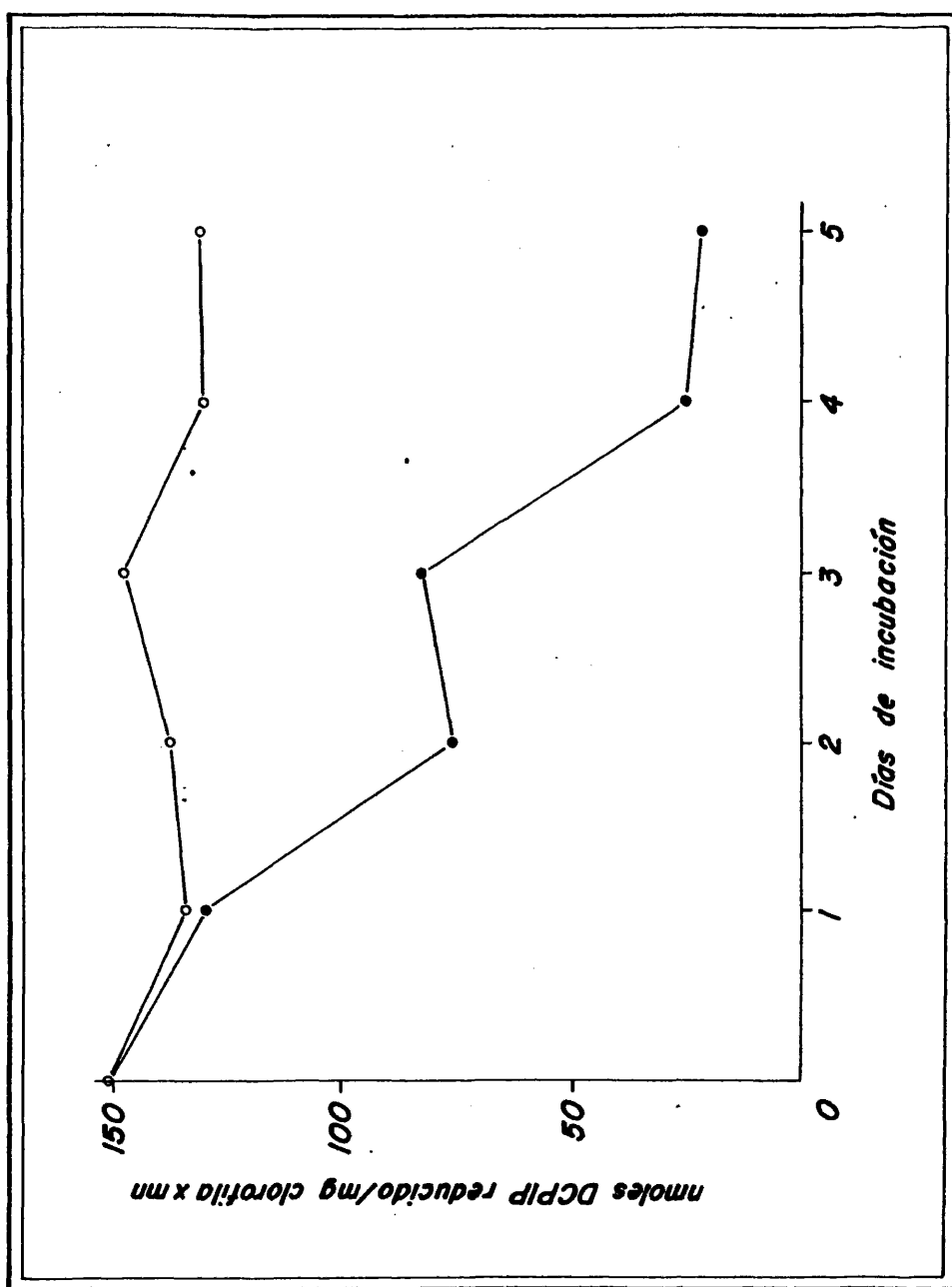
De la misma manera que se habían estimado las consecuencias del tratamiento de los esquejes de *Q. rotundifolia* con la mezcla de las cuatro sustancias aisladas del líquen, se estimó también en qué proporción contribuía cada uno de estos compuestos al efecto inhibidor observado.

En el histograma nº 1 se expresa la pérdida total de actividad específica sufrida al cabo de seis días por los cloroplastos procedentes de hojas de ramitas incubadas con ácido evérnico, ácido úsnico, atranorina o cloroatranorina aisladas por cromatografía en capa fina a partir de la mezcla original obtenida del

GRAFICA N° 6

Actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos aislados
de hojas de Quercus rotundifolia

- O ——— O procedentes de ramas control
- ——— ● procedentes de ramas tratadas con sustancias líquénicas
de Evernia prunastri



HISTOGRAMA N° 1

Representación de la pérdida total de actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos aislados de hojas de Q. rotundifolia, después de seis días de incubación

C : en CO₃HNa 1mM (controles)

M : en CO₃HNa 1mM + la mezcla de las cuatro sustancias líquénicas de

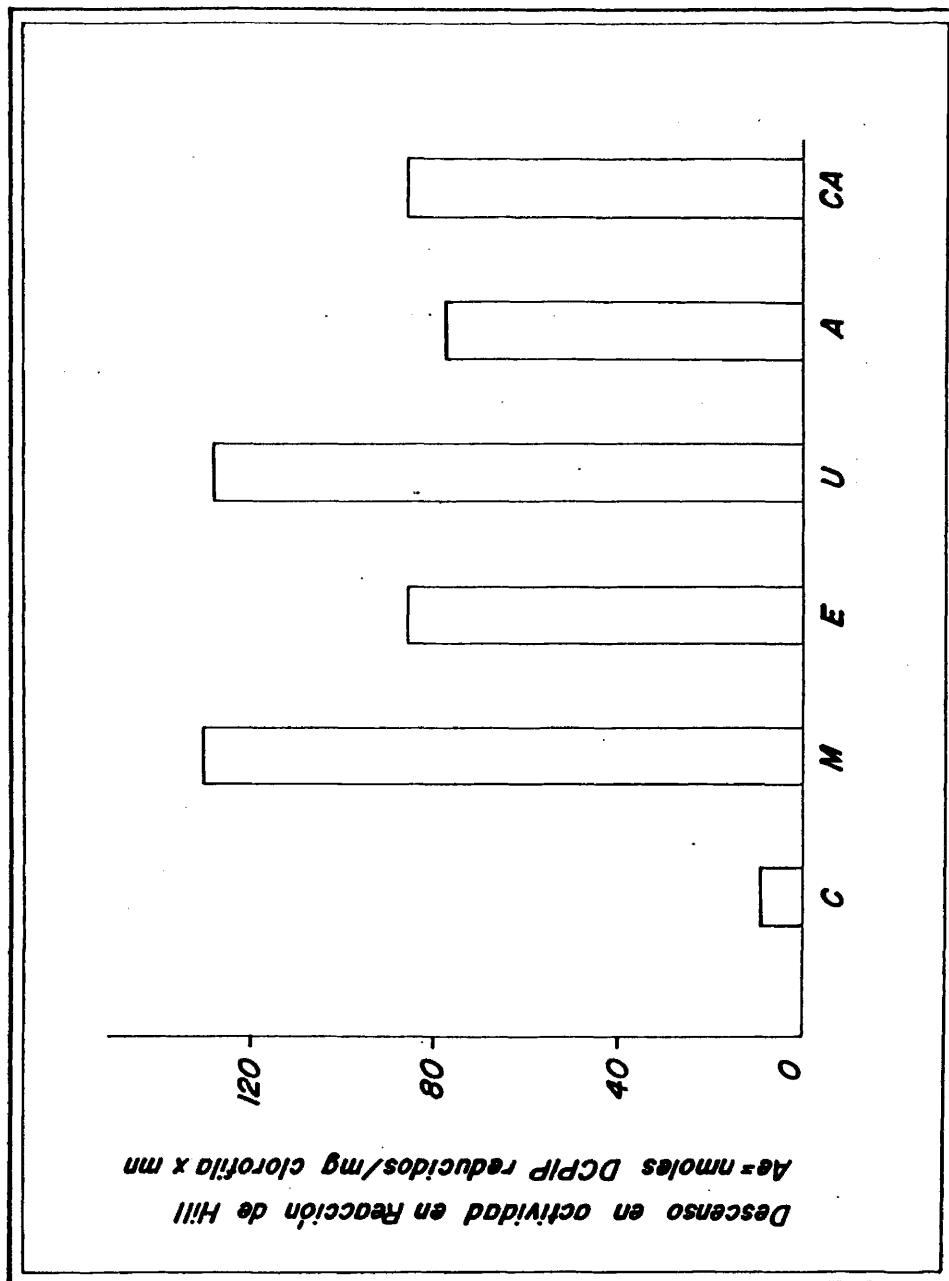
E. prunastri (14 µg/ml)

E : en CO₃HNa 1mM + ácido evérnico (14 µg/ml)

U : en CO₃HNa 1mM + ácido úsnico (14 µg/ml)

A : en CO₃HNa 1mM + atranorina (14 µg/ml)

CA: en CO₃HNa 1mM + cloroatranorina (14 µg/ml)



talo liquénico. Los valores se comparan con las variaciones correspondientes a los cloroplastos control y a los procedentes de los esquejes tratados con la mezcla original. Se aprecia claramente en el histograma que el ácido úsnico es el que presenta mayor efecto inhibitor, siendo éste del mismo orden de magnitud que el ejercido por la mezcla de los cuatro compuestos. También las otras tres sustancias actúan negativamente sobre la capacidad fotolítica del cloroplasto y, aun siendo su efecto menos pronunciado, no deja de ser importante; son comparables los del ácido evérnico y la cloroatranorina y ligeramente inferior el de la atranorina.

4.3. Restauración de la actividad fotolítica por Cl_2Mn .

En ensayos realizados con cloroplastos sometidos a una preincubación con Cl_2Mn previa a la medida de su capacidad fotolítica se comprobó que la adición de manganeso a la suspensión de cloroplastos consigue revertir el efecto provocado por las sustancias liquénicas, tanto cuando éstas eran añadidas al medio de incubación en forma de la mezcla original como cuando se añadía separadamente cada compuesto purificado.

En la gráfica nº 7 se comprueba que los cloroplastos que han sido aislados a partir de esquejes incubados con sustancias liquénicas y han sido luego preincubados con Cl_2Mn , mantienen un nivel de actividad específica bastante aproximado al del día 0 en que se inició el tratamiento.

En la tabla nº 2 se ha expresado la pérdida media diaria de unidades de actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos procedentes de esquejes control y de esquejes tratados con cada una de las cuatro sustancias liquénicas extraídas de

GRAFICA N° 7

Actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos aislados de hojas de Quercus rotundifolia, preincubados con Cl_2 Mn previo al ensayo de su capacidad fotolítica

O ——— cloroplastos obtenidos a partir de hojas de ramas de control

● ——— cloroplastos obtenidos a partir de hojas de ramas tratadas con sustancias líquénicas de Evernia prunastri

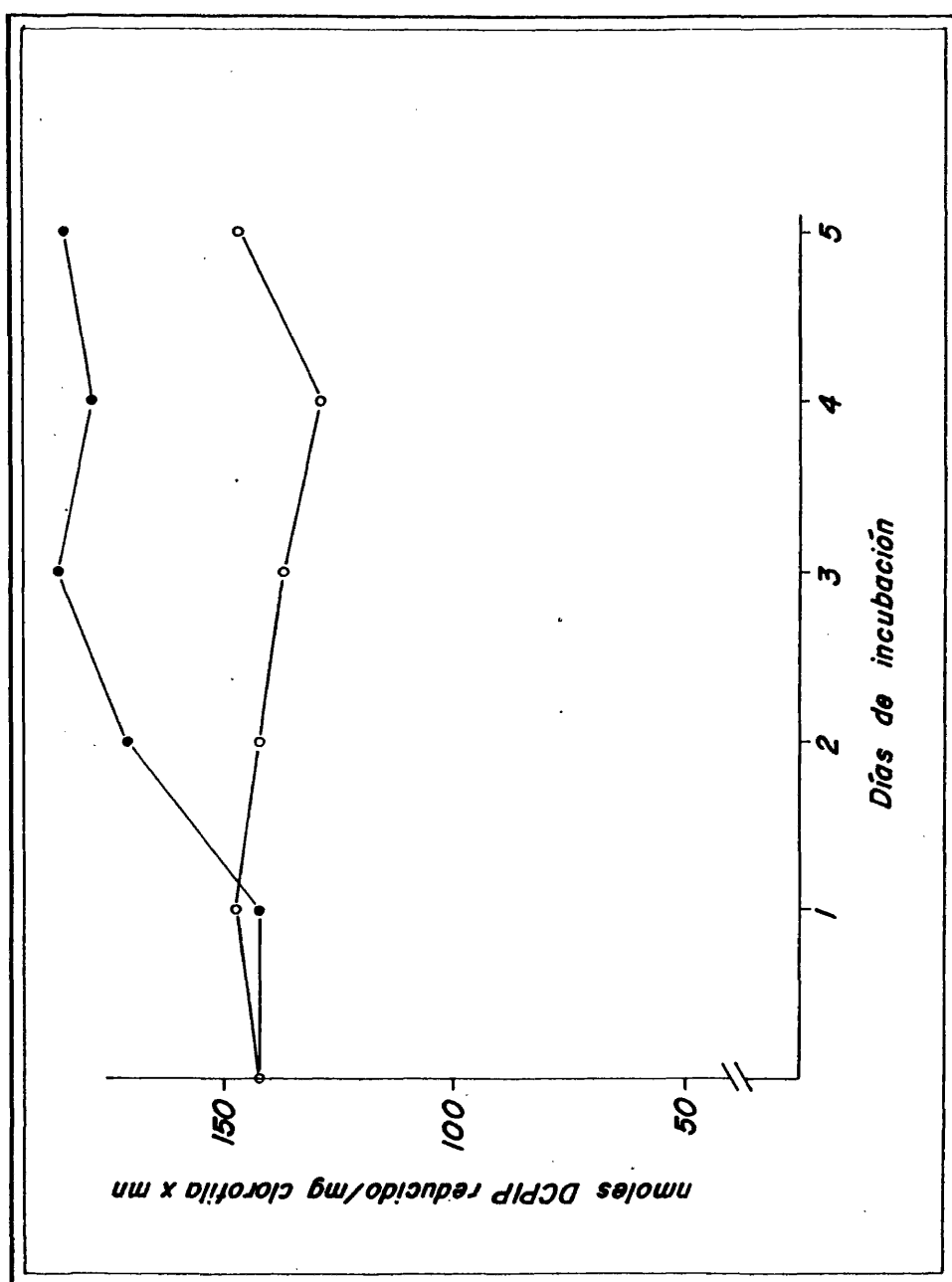


TABLA N° 2

Variación media diaria de actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos aislados de ramas de Q. rotundifolia sometidas a distintos tratamientos, con o sin preincubación de los cloroplastos con Cl_2Mn previo al ensayo de su capacidad fotolítica.

Sustancia líquénica añadida al medio de incubación	Preincubación de cloroplastos aislados con Cl_2Mn	Variación de la actividad en Reacción de Hill (uds./día)
---	-	- 1,7
	+	+ 1,7
Acido evérnico	-	- 17,3
	+	- 3,4
Acido úsnico	-	- 25,9
	+	+ 8,6
Cloroatranorina	-	- 17,3
	+	- 7,7
Atranorina	-	- 15,5
	+	- 1,7

E. prunastri. También indica cuál es la variación media diaria de los mismos cloroplastos preincubados con Cl_2Mn . Los datos de la tabla no dejan lugar a dudas de que en todos los casos, la adición de la sal contrarresta bastante eficazmente el efecto ejercido por los fenoles líquénicos.

4.4. Efecto de la adición de hormonas a los medios de incubación.

Cuando en el medio de incubación preparado con sustancias líquénicas se añadían hormonas vegetales, no se detectaba -- ninguna respuesta en forma de protección ejercida frente al efecto de los fenoles. Tanto en los experimentos en que se incluyó kinetina 10^{-4} M como aquéllos en los que la hormona añadida era el ácido giberélico (10^{-4} M) los datos obtenidos fueron muy similares y no presentaban diferencias significativas respecto a las experiencias realizadas con sustancias líquénicas pero sin hormonas. Los valores de actividad específica en Reacción de Hill obtenidos con los tratamientos hormonales se representan en la gráfica nº 8.

5. CONTENIDOS CLOROPLASTICOS EN MANGANESO.

Habida cuenta de la recuperación de la actividad fotolítica en los cloroplastos aislados de hojas de ramas tratadas con -- sustancias líquénicas cuando estos cloroplastos eran preincubados con Cl_2Mn , se procedió a valorar los niveles cloroplásticos del ion Mn^{2+} correspondientes a ramas control y a ramas incubadas con los fenoles líquénicos.

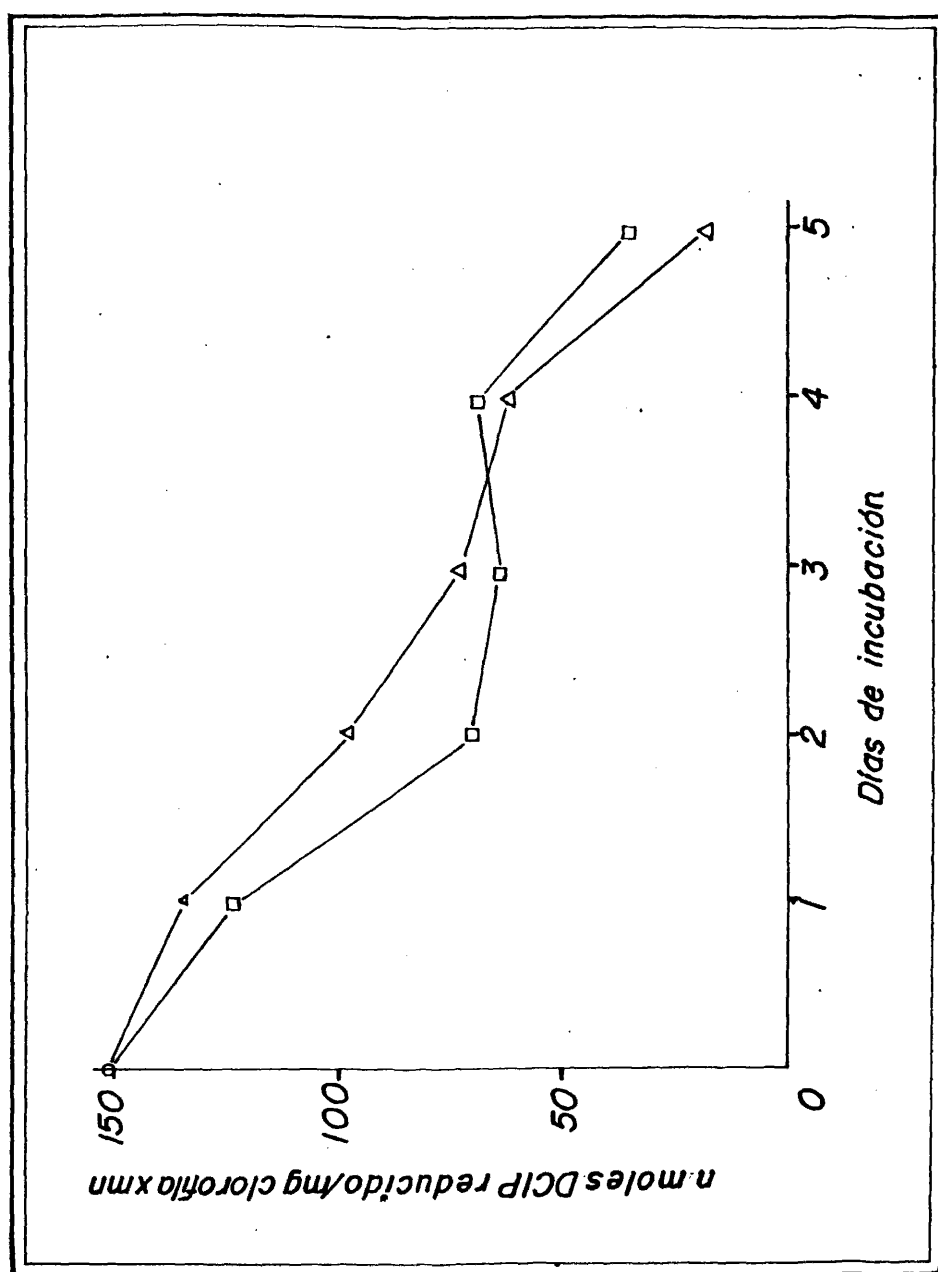
Los resultados de estas valoraciones demuestran, tal como se observa en la gráfica nº 9, que el tratamiento con estos productos del líquen se corresponde con una desaparición del ión

GRÁFICA N° 8

Actividad específica en Reacción de Hill de cloroplastos aislados de ho-

jas de ramas de Q. rotundifolia incubadas

△ ————— Δ en CO₃HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) + kinetina 10⁻⁴M 101
 □ ————— □ en CO₃HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) + ácido giberélico 10⁻⁴M



GRAFICA N° 9

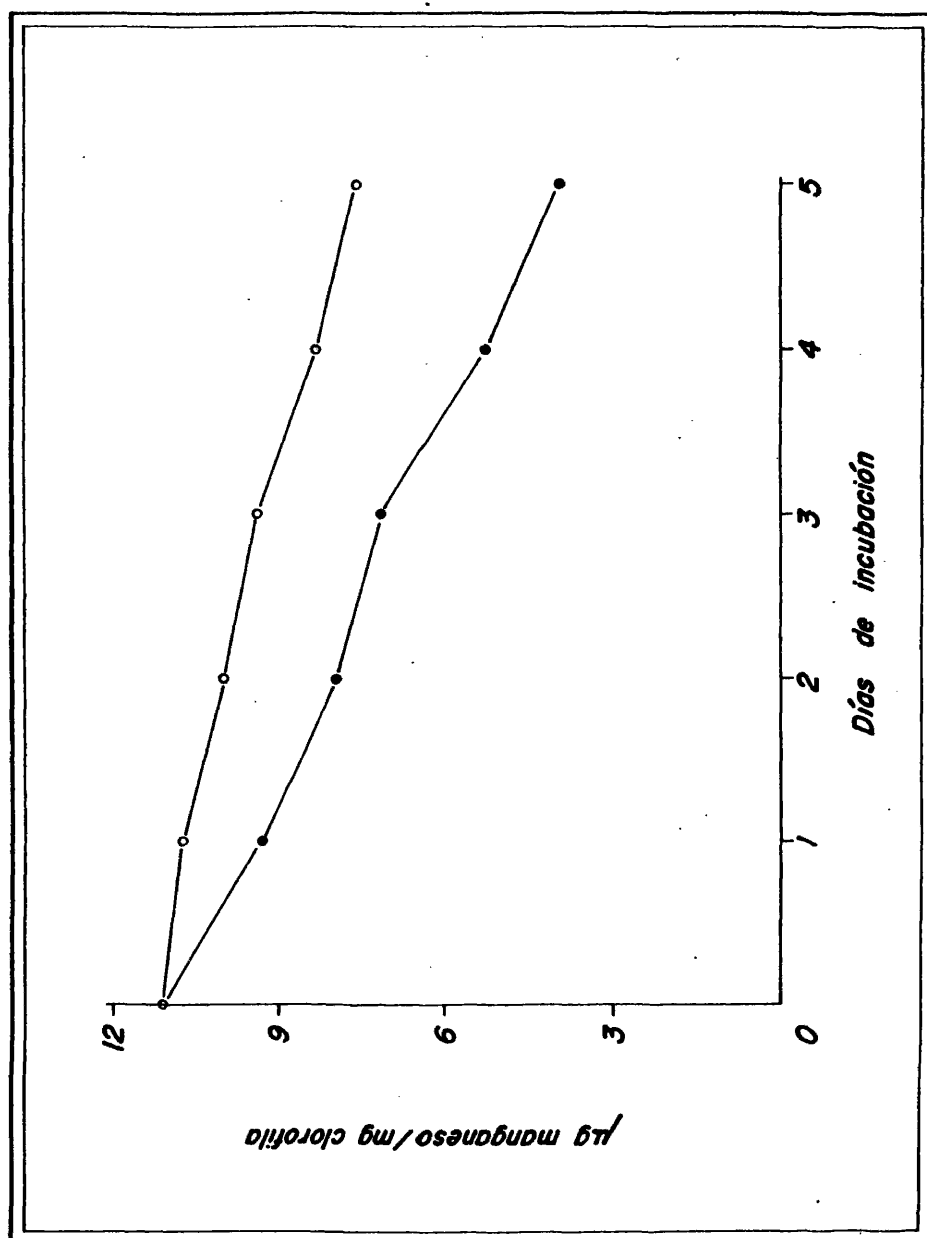
Concentración de Mn^{2+} en cloroplastos aislados a partir de esquejes de Q. rotundifolia

O ——— O incubados en ausencia de sustancias líquénicas de

E. prunastri.

● ——— ● incubados en presencia de sustancias líquénicas de

E. prunastri.



de los cloroplastos. La concentración de manganeso desciende también ligeramente en los cloroplastos control, pero la diferencia existente entre esta concentración y la de los cloroplastos tratados es altamente significativa. Además, esta diferencia se va haciendo progresivamente mayor con los días de tratamiento.

6. EFECTO DE LAS SUSTANCIAS LIQUENICAS SOBRE LOS NIVELES FOLIARES DE AZUCARES REDUCTORES Y TOTALES. EFECTO DE LA ADICION DE HORMONAS A LOS MEDIOS DE INCUBACION.

La evolución que siguen los contenidos foliares en -- azúcares reductores es bastante similar a la de los azúcares totales, tanto cuando se comparan los extractos obtenidos de hojas de ramas control como cuando se trata de hojas de ramas incubadas en presencia de las sustancias líquénicas.

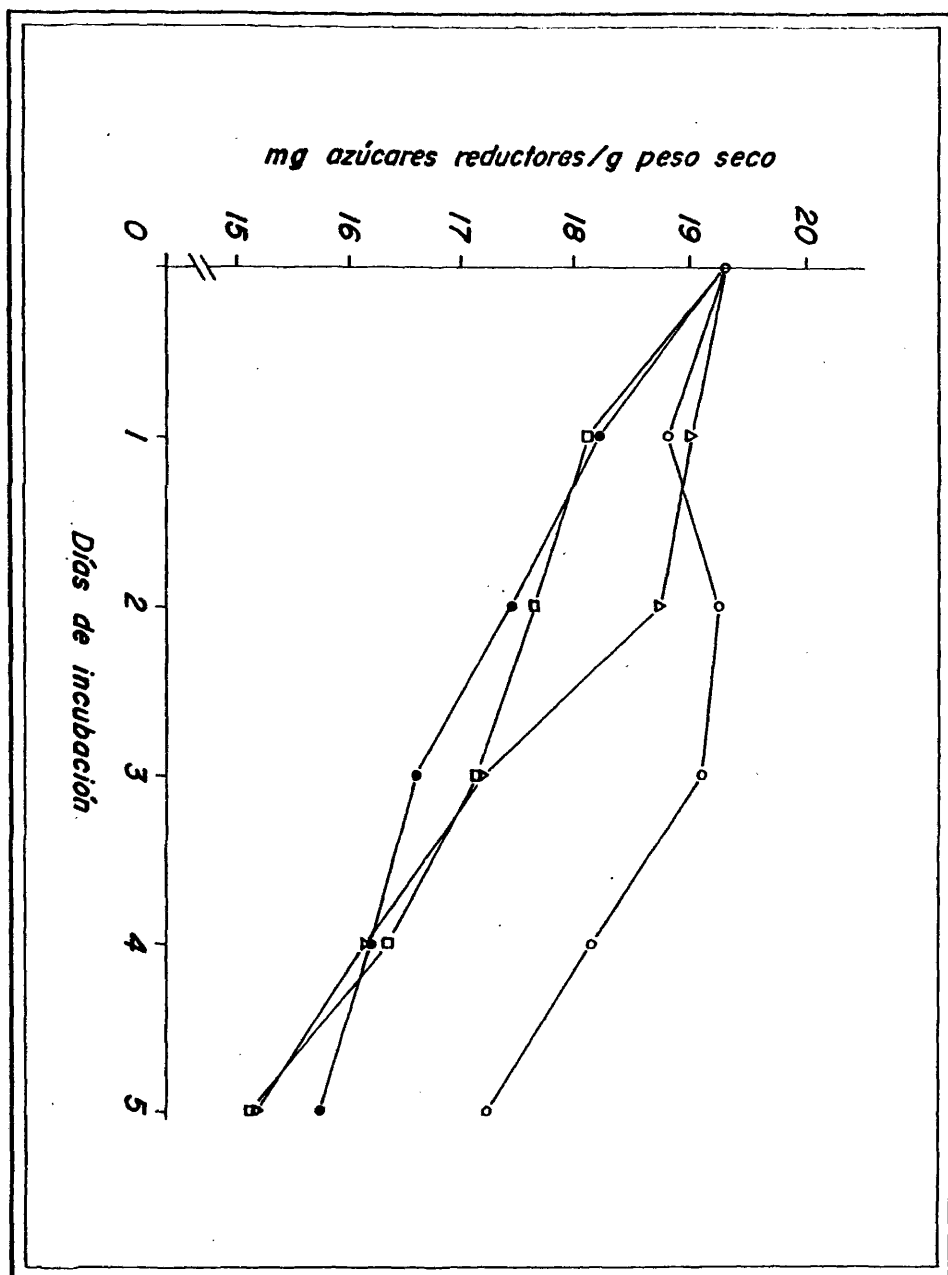
Respecto a los azúcares reductores, se observa en la gráfica nº 10 que existe un claro descenso en los extractos de hojas que han sufrido el efecto de las sustancias líquénicas, respecto al contenido de los controles. Este descenso es ya notorio en el primer día de tratamiento, aunque el efecto final observado no es tan drástico como el que tiene lugar a nivel de Reacción de Hill.

Los valores de contenido en azúcares totales se expresan en la gráfica nº 11 y siguen un comportamiento comparable a los azúcares reductores: También en este caso se da una apreciable caída en los niveles medidos en hojas de ramas tratadas respecto a las no tratadas, pero sin que se trate de un efecto totalmente brusco.

GRAFICA N° 10

Niveles foliares de azúcares reductores. Los extractos se obtuvieron a partir de esquejes incubados en

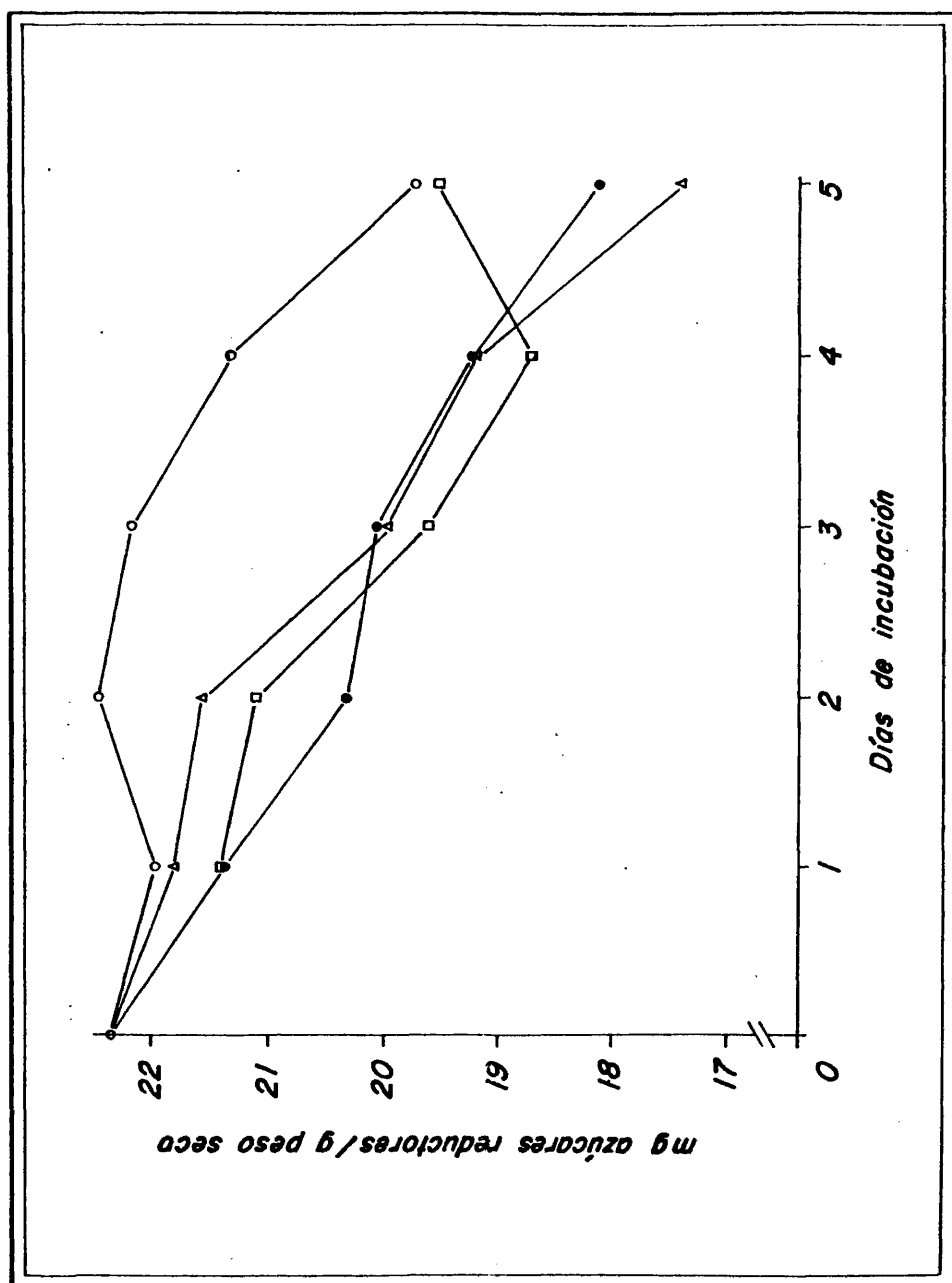
- O ——— O CO_3HNa 1mM
- ——— ● CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$)
- Δ ——— Δ CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + Kinetina 10^{-4}M
- \square ——— \square CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M



GRAFICA N° 11

Niveles foliares de azúcares totales. Los extractos se obtuvieron a par
tir de esquejes incubados

- O ——— O en CO_3HNa lmM
- ——— ● en CO_3HNa lmM + sustancias líquénicas ($14 \mu\text{g/ml}$)
- △ ——— △ en CO_3HNa lmM + sustancias líquénicas ($14 \mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M
- ——— □ en CO_3HNa lmM + sustancias líquénicas ($14 \mu\text{g/ml}$) + ácido.giberélico 10^{-4}M



Los tratamientos con hormonas vegetales en los medios de incubación preparados con sustancias liquénicas tienen un efecto protector frente a los fenoles, ya que tanto la kinetina como el ácido giberélico consiguen disminuir la pérdida de azúcares reductores hasta el cuarto día de incubación, en que los valores se hacen iguales para los tres tratamientos en los que se han añadido los componentes del líquen. (Gráfica nº 10).

La situación es bastante similar cuando se trata de los azúcares totales aunque, como se observa en la gráfica nº 11, el efecto protector sólo tiene lugar hasta el tercer día de incubación.

7. ALTERACIONES DEL METABOLISMO DEL ALMIDON PROVOCADAS POR LA INCUBACION CON SUSTANCIAS LIQUENICAS. EFECTO DE LA ADICION DE HORMONAS A LOS MEDIOS DE INCUBACION.

7.1. Evolución de las reservas de almidón.

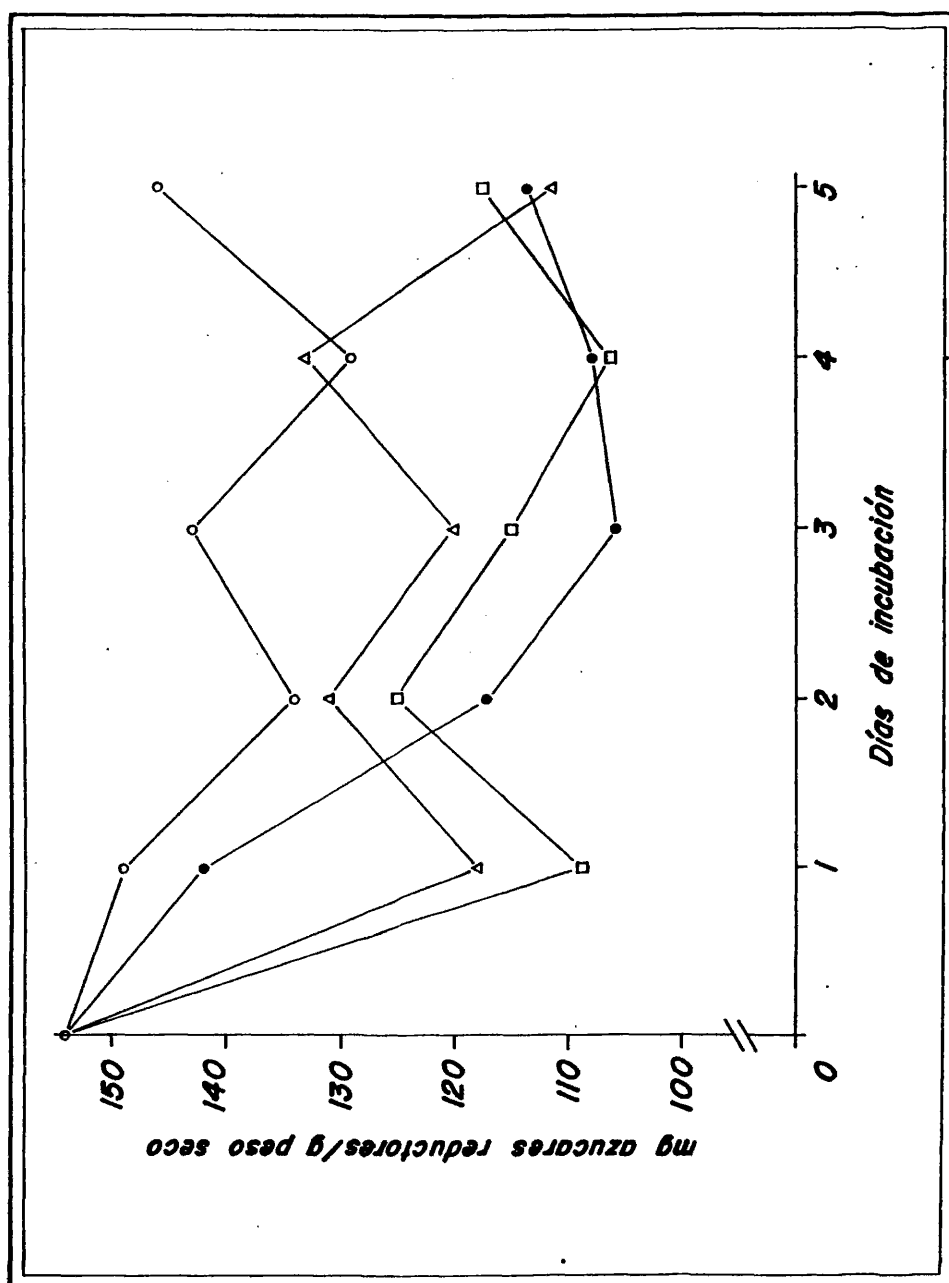
La gráfica nº 12 muestra la evolución seguida por las reservas foliares de almidón con los cuatro tratamientos ensayados: el control, la adición de sustancias liquénicas al medio de incubación y la suplementación de este segundo medio con kinetina o con ácido giberélico. Se trata de una gráfica muy interesante por cuanto es capaz de explicar la evolución seguida por los azúcares reductores y totales, con los distintos tratamientos.

Mientras que la cantidad de almidón de las hojas de las ramas control no parece descender significativamente, el tratamiento con sustancias liquénicas provoca una drástica bajada en la concentración de este polímero, que parece en cierto modo

Evolución de las reservas de almidón en hojas de ramas de Q. rotundifolia
incubadas

- O — O en CO₃HNa 1mM
- — ● en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14µg/ml)
- Δ — Δ en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14µg/ml) + kinetina 10⁻⁴M
- — □ en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14µg/ml) + ácido giberélico 10⁻⁴M





estabilizarse a partir del tercer día del tratamiento. La presencia de kinetina en el medio de incubación supone un descenso aún más brusco en las reservas de almidón, descenso que tiene lugar en el primer día de tratamiento. La misma situación, un poco más accentuada, se presenta cuando la hormona añadida al medio de incubación de las ramas de Q. rotundifolia ha sido el ácido giberélico.

7.2. Salida de azúcares a los medios de incubación.

La salida de azúcares a los medios de incubación se midió para los cuatro tratamientos y los valores obtenidos, que se representan en la gráfica nº 13, concuerdan en cierto modo con la desaparición de las reservas de almidón de las hojas. En efecto, las cantidades de azúcares valoradas en los medios de incubación después del primer día de tratamiento son bastante similares en las ramas control y las tratadas con sustancias liquénicas, pero son sin embargo notablemente superiores en los casos en que las hormonas habían sido añadidas a los medios de incubación junto con las sustancias liquénicas. Esta cantidad es mayor en el caso del ácido giberélico que en el caso de la kinetina.

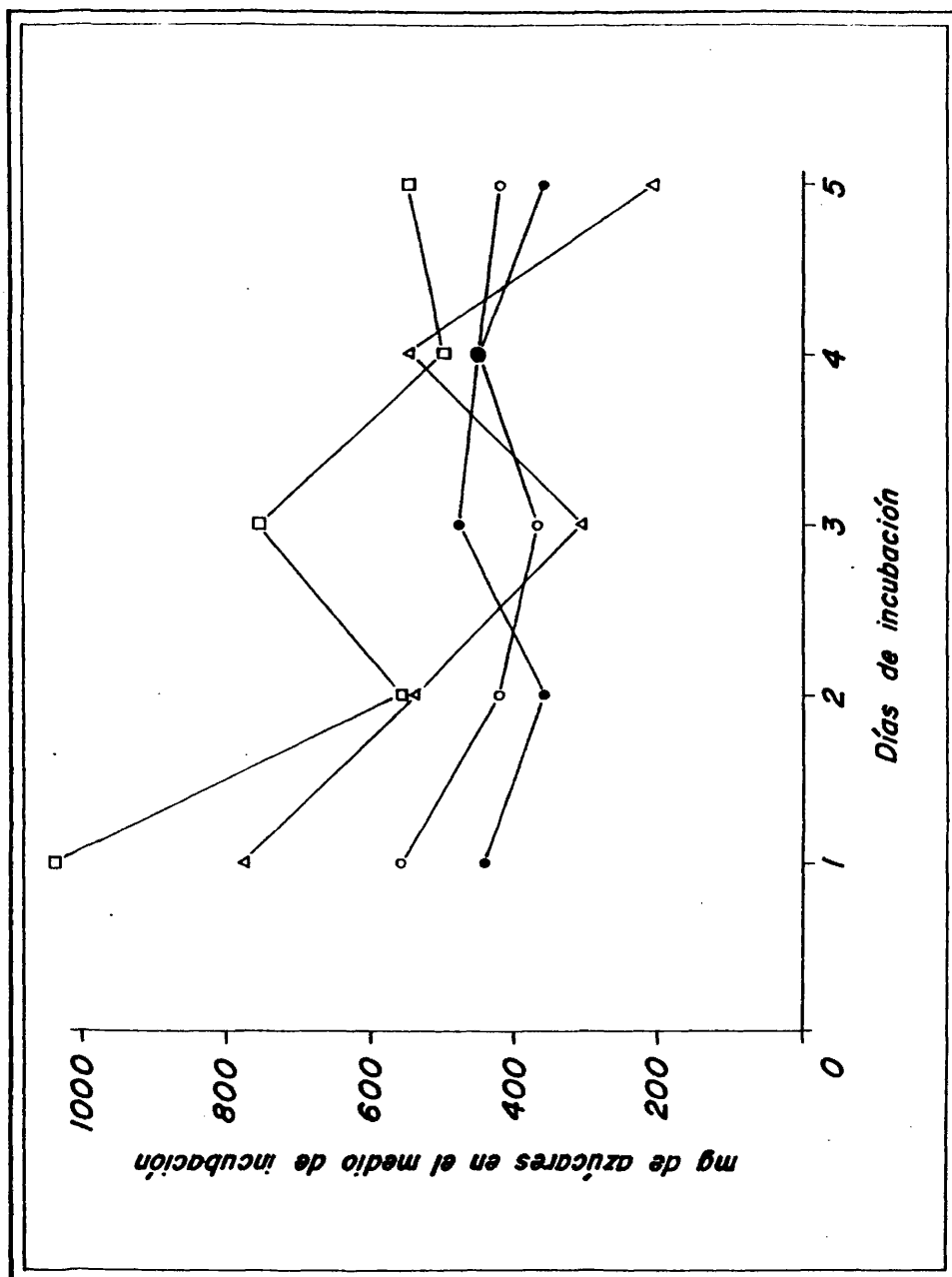
7.3. Respiración foliar.

También la medida del proceso de respiración foliar da una respuesta complementaria a la evolución de las reservas almidonadas.

Como se observa en la gráfica nº 14, desde el primer momento las hojas de ramas sometidas al tratamiento de incubación con los compuestos liquénicos, muestran una alta actividad respiratoria, que va incrementado hasta el segundo día, a partir del cual

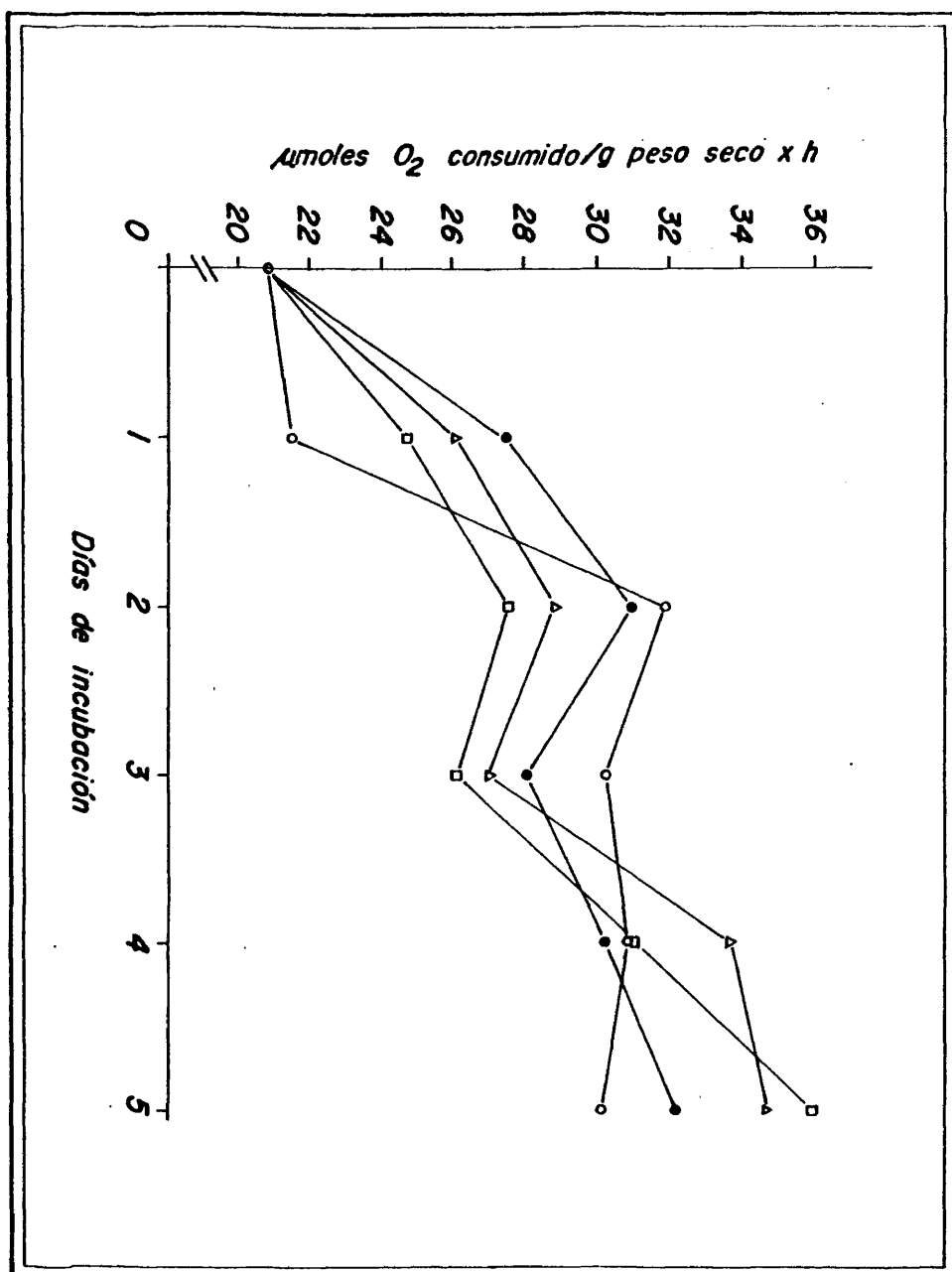
Salida de azúcares al medio de incubación.

- — ○ esquejes incubados en CO₃HNa 1mM
● — ● esquejes incubados en CO₃HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml)
△ — △ esquejes incubados en CO₃HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) +
 kinetina 10⁻⁴M
□ — □ esquejes incubados en CO₃HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) +
 ácido giberélico 10⁻⁴M



Medida de la respiración foliar.

- O — esquejes incubados en CO_3HNa 1mM
- — esquejes incubados en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas ($14\text{ }\mu\text{g/ml}$)
- △ — esquejes incubados en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas ($14\text{ }\mu\text{g/ml}$) +
kinetina 10^{-4}M
- — esquejes incubados en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas ($14\text{ }\mu\text{g/ml}$) +
ácido giberélico 10^{-4}M



ya se mantiene. Cuando en el medio de incubación de los esquejes estaba presente la kinetina además de las sustancias liquénicas, esta actividad era algo menor y tardaba más tiempo en estabilizarse. Lo mismo ocurre cuando la hormona empleada ha sido el ácido giberélico, siendo en este caso la evolución de la actividad respiratoria a lo largo de los días de tratamiento, paralela a la descrita para la kinetina pero con valores algo inferiores. En el caso de las ramas control, la actividad respiratoria no sufre incremento sobre el valor medido a tiempo o hasta el segundo día, manteniéndose a partir de entonces dentro de valores muy semejantes.

8. NIVELES DE LIPIDOS TOTALES.

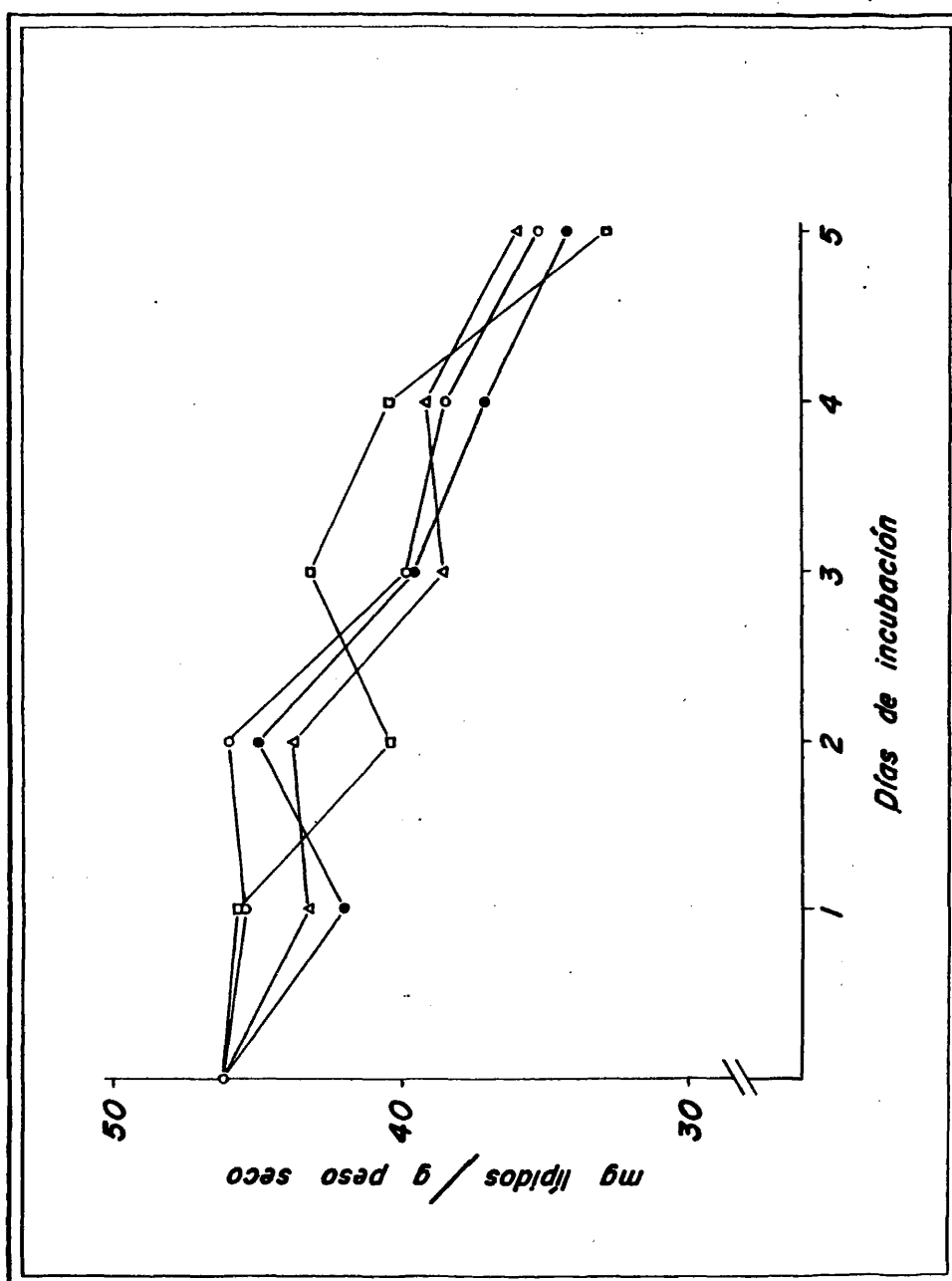
Se midió la cantidad de lípidos en extractos obtenidos a partir de hojas de ramas control incubadas en ausencia de sustancias liquénicas y también de ramas tratadas con estos fenoles, con o sin la adición de las hormonas kinetina y ácido giberélico.

Los resultados obtenidos se expresan en la gráfica nº 15, de la que se desprende que no existe efecto por parte de las sustancias liquénicas a este nivel. Para los cuatro tratamientos se observa una cierta disminución de los contenidos lipídicos de las hojas, disminución que es gradual a lo largo de los días de experimentación, y que sigue una evolución bastante paralela en los cuatro casos.

9. EFECTO ACELERADOR DE LA SENESCENCIA FOLIAR DE LAS SUSTANCIAS LIQUENICAS. PAPEL PROTECTOR DE LAS HORMONAS KINETINA Y ACIDO GIBERELICO.

Niveles de lípidos totales en extractos de esquejes de Q. rotundifolia.

- — incubados en CO_3HNa mM
- — incubados en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$)
- △ — incubados en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) +
kinetina 10^{-4}M
- — incubados en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) +
ácido giberélico 10^{-4}M



9.1. Contenido en agua y contenido hídrico relativo del tejido foliar.

En la gráfica nº 16 se describen las variaciones de contenido en agua de las hojas de esquejes de Q. rotundifolia con los cuatro tratamientos distintos. En las muestras tratadas con sustancias liquénicas exclusivamente, se observa una aceleración de la pérdida de agua que acompaña a los procesos de senescencia foliar, siendo la diferencia más acentuada en los primeros días del tratamiento. Las dos hormonas vegetales ensayadas, la kinetina y el ácido giberélico, son capaces de disminuir la pérdida de agua por parte de las hojas durante los dos primeros días de tratamiento, cuando son añadidas al medio de incubación. A partir del tercer día desaparece el efecto protector e incluso aceleran aún más la desecación.

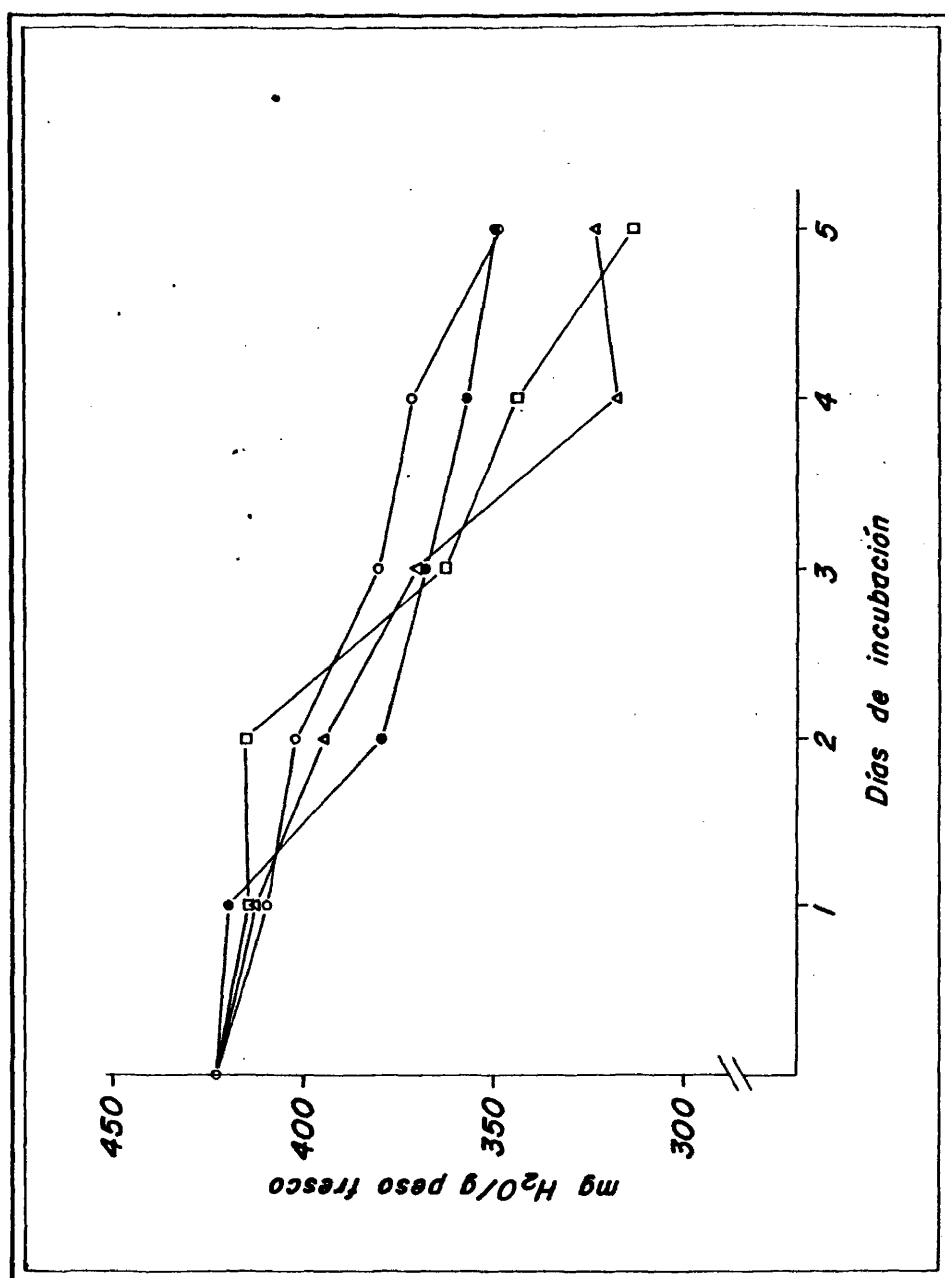
Cuando se procedió al estudio del contenido hídrico relativo, se obtuvieron unos resultados que estaban en completo acuerdo con los correspondientes a las valoraciones de contenido total en agua de las hojas. En la gráfica nº 17 se puede apreciar cómo también las sustancias liquénicas añadidas al medio de incubación tienen un efecto negativo sobre este parámetro, pues hacen disminuir sus valores respecto a los de las hojas control. Al igual que en el caso anterior, tanto la kinetina como el ácido giberélico ejercen un efecto protector, que se traduce en el mantenimiento de valores altos del índice medido, incluso por encima de los de las hojas control, pero también aquí la protección desaparece a partir del tercer día de tratamiento.

9.2. Abscisión foliar.

GRAFICA N° 16

Contenido en agua de hojas de ramas de Q. rotundifolia incubadas

- O ——— O en CO_3HNa mM
- ——— ● en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$)
- Δ ——— Δ en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M
- \square ——— \square en CO_3HNa mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M

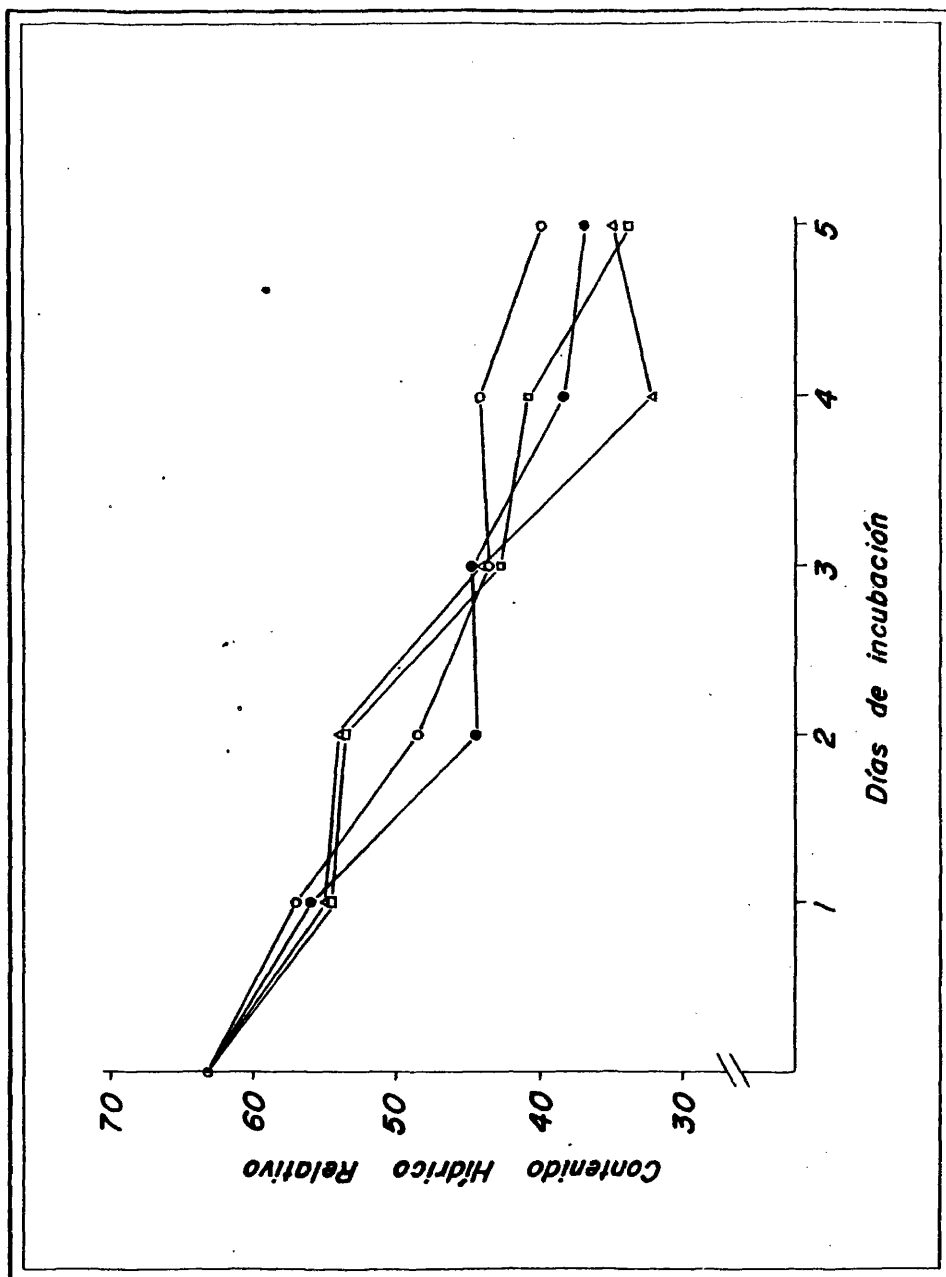


GRAFICA N° 17

Contenido Hídrico Relativo de hojas de ramas de Q. rotundifolia incu-

badas

- 124
- O ——— O en CO₃HNa 1mM
 - ——— ● en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14 µg/ml)
 - Δ ——— Δ en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14 µg/ml) + kinetina 10⁻⁴M
 - ——— □ en CO₃HNa 1mM + sustancias liquénicas (14 µg/ml) + ácido giberélico 10⁻⁴M



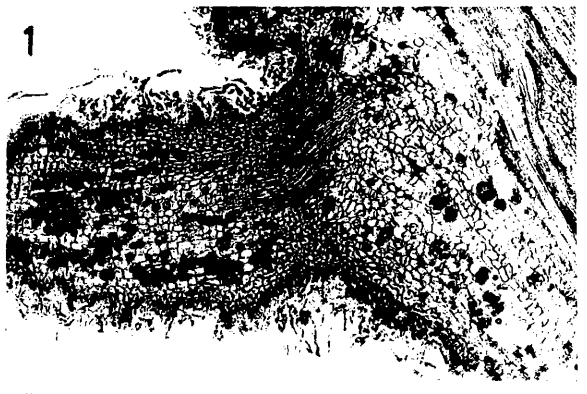
9.2.1. Estudio microscópico de la abscisión: Considerando que el proceso desencadenado por la adición de sustancias liquénicas al medio de incubación suponía a la larga una aceleración de la senescencia, se hizo el estudio microscópico de la abscisión en hojas de ramas mantenidas con los distintos tratamientos descritos en los experimentos anteriores, con vistas a comprobar si la presencia de sustancias liquénicas en el medio de incubación aceleraba la formación de la zona de abscisión.

En las láminas 17 a la 20 se muestran fotografías obtenidas de algunas de las preparaciones para microscopio óptico realizadas a lo largo de la experimentación; correspondientes a secciones longitudinales de peciolo foliares. En la lámina 17 se pueden observar dos muestras de las preparadas a tiempo 0, esto es, el mismo día que se obtuvieron los esquejes. Las láminas 18, 19 y 20 corresponden respectivamente a ejemplos representativos de las preparaciones obtenidas los días 5º, 10º y 20º del experimento, y en cada lámina se incluye una muestra correspondiente al tratamiento control, una correspondiente al tratamiento con sustancias liquénicas y una correspondiente a cada uno de los tratamientos en que se añadían hormonas a los medios de incubación.

Como bien se deduce del estudio de estas cinco láminas, que representan fielmente al conjunto de todos los peciolo observados día a día, en las hojas de encina no tiene lugar la formación de una zona de abscisión paralela a la senescencia de la hoja, sino que esta zona de abscisión se forma ya en la ontogenia foliar. En efecto, desde el día inicial se observa a través del peciolo una barrera integrada por células de menor tamaño que el resto de

LAMINA 17

Fig. 1 y 2: Secciones longitudinales a través
de peciolo foliares de Q. rotundifolia
sin ningún tratamiento (control a tiempo 0)



x 135



LAMINA 18

Secciones longitudinales a través de peciolo
foliares de Q. rotundifolia en el 5º día de tra
tamiento

Fig. 1: incubación en CO_3HNa 1mM

Fig. 2: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M

Fig. 4: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M



x 135



LAMINA 19

Secciones longitudinales a través de peciolo
foliares de Q. rotundifolia en el 10° día de
tratamiento

Fig. 1: incubación en CO_3HNa 1mM

Fig. 2: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M

Fig. 4: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M



x 135



LAMINA 20

Secciones longitudinales a través de peciolo
foliares de Q. rotundifolia en el 20° día de
tratamiento

Fig. 1: incubación en CO_3HNa 1mM

Fig. 2: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M

Fig. 4: incubación en CO_3HNa 1mM + sustancias liquénicas
(14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M

13A



x 135



las de la hoja y carente de esclereidas, que son muy abundantes en toda la rama y en el resto del peciolo foliar. Esta zona no sufre transformación a lo largo del tiempo con ninguno de los tratamientos, sin que llegue a producirse la digestión de paredes celulares en la región proximal a la rama que suele marcar en otras hojas el momento de la abscisión.

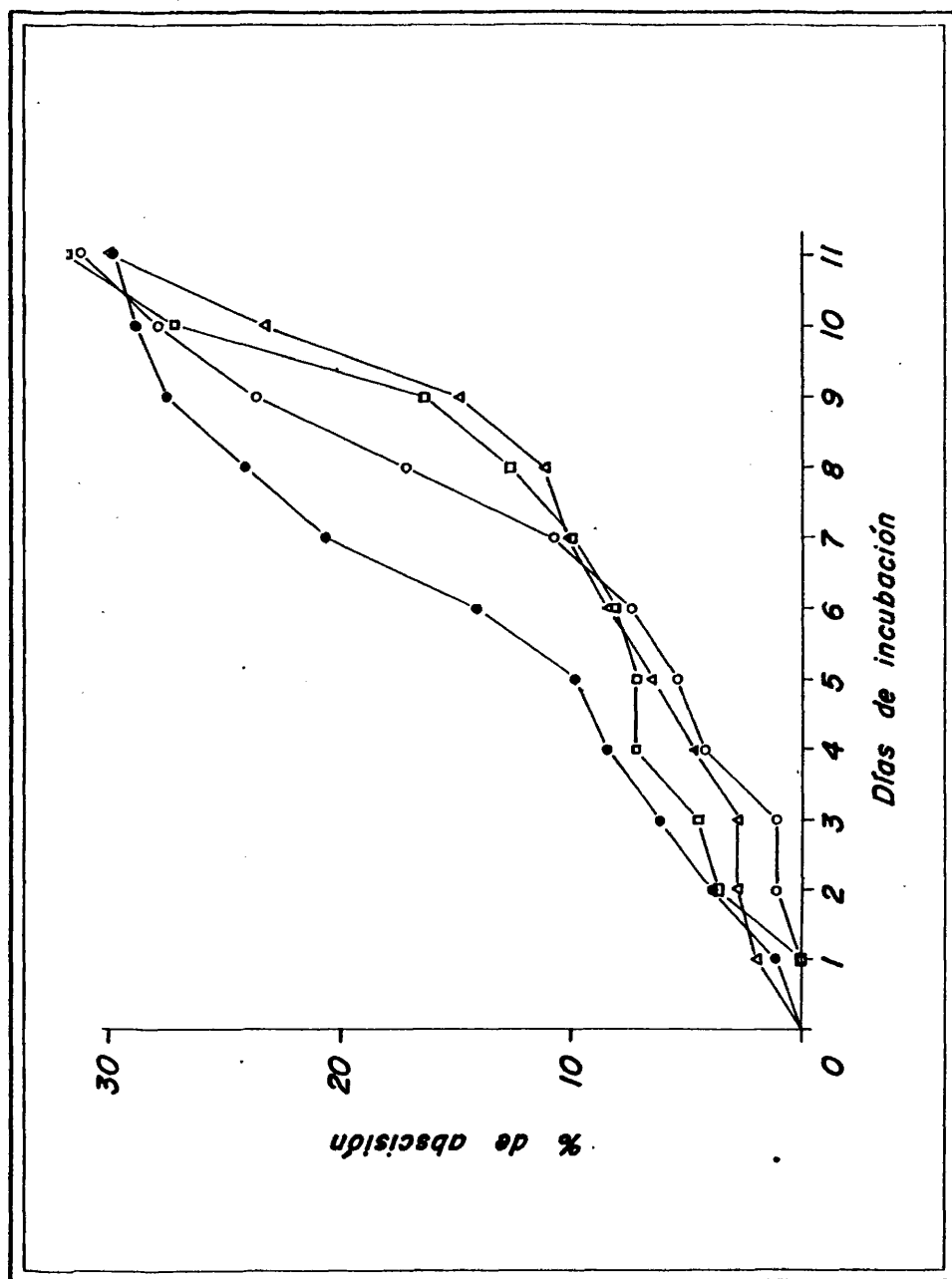
9.2.2. Estimación de la tendencia a la abscisión: Los resultados obtenidos cuando se estimó la tendencia a la abscisión de las hojas de esquejes sometidas a los diferentes tratamientos fueron concluyentes a la hora de determinar el efecto acelerador de la senescencia provocado por las sustancias liquénicas. Como se deduce de la gráfica nº 18 en la que se han representado los datos obtenidos en este experimento, la presencia de los fenoles liquénicos en el medio de incubación supone un mayor tanto por ciento de abscisión respecto al tanto por ciento valorado para las hojas de los esquejes control. La diferencia entre ambos tratamientos va acentuándose hasta el día 72, en que es máxima, para disminuir luego progresivamente hasta desaparecer.

Las hormonas vegetales añadidas a los medios de incubación que contienen sustancias liquénicas, resultan en esta ocasión eficaces protectores contra la aceleración de la abscisión provocada por los fenoles. Durante los primeros días de tratamiento, las ramas correspondientes a los tratamientos hormonales arrojan unos valores intermedios entre los controles y los tratamientos con sustancias liquénicas pero sin hormonas. Entre los días 62 y 72, en que aparece la máxima diferencia entre aquéllos, ambas hormonas llegan a ejercer una protección total, dando unos valores simila-

GRAFICA N° 18

Tendencia a la abscisión de hojas de esquejes de Q. rotundifolia incubados

- O ——— O en CO₃HNa mM
 ● ——— ● en CO₃HNa mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml)
 Δ ——— Δ en CO₃HNa . mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) + kinetina 10⁻⁴M
 □ ——— □ en CO₃HNa mM + sustancias líquénicas (14 µg/ml) + ácido giberélico 10⁻⁴M



res a los de los controles, y, a partir de entonces, incluso mantienen los niveles de abscisión por debajo de estos últimos. Durante todo el tiempo de experimentación el efecto protector de la kinetina a este nivel es algo superior al del ácido giberélico.

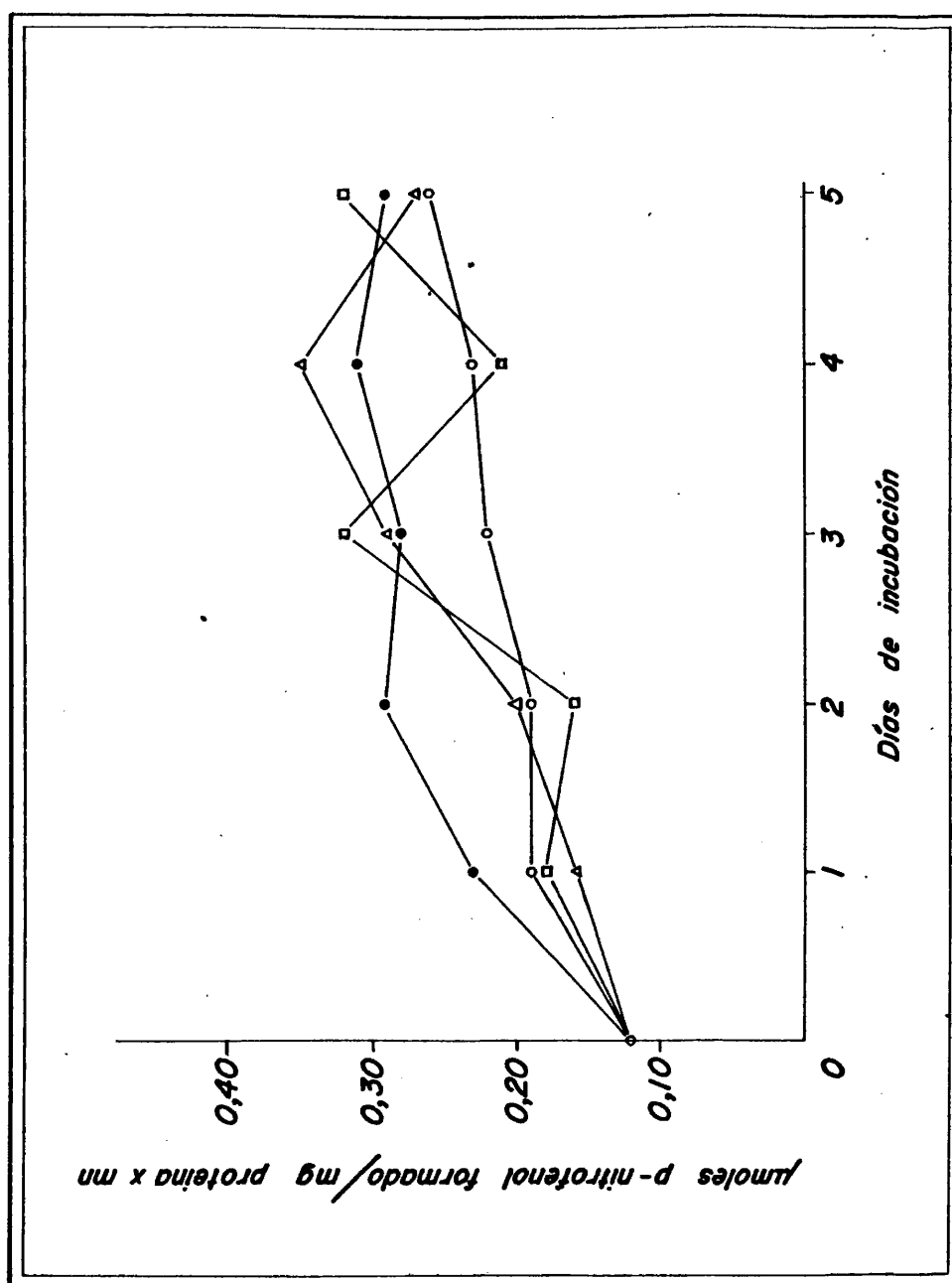
9.3. Actividad fosfatasa ácida.

El tratamiento de las ramas de encina con los compuestos liquénicos provoca también un incremento en la actividad fosfatasa ácida de las hojas, si se compara con los niveles medidos en las mismas condiciones en las ramas control. En el caso de la actividad fosfatásica localizada en la fracción soluble, este incremento es máximo en el segundo día, manteniéndose siempre por encima de los valores de actividad específica de las ramas control. La evolución de la actividad específica en la fracción soluble se representa en la gráfica nº 19, en la que también se aprecia que tanto la adición de kinetina como de ácido giberélico al medio de incubación que contiene sustancias liquénicas, son capaces de mantener los niveles de actividad específica del enzima alrededor de los valores del control durante los primeros días, pero a partir del tercero el efecto protector desaparece.

En la gráfica nº 20 se ha representado la evolución de la actividad específica del enzima ligada membrana. Los resultados son más definitivos en este caso puesto que las sustancias liquénicas están provocando un aumento de la actividad desde el principio y la diferencia respecto a los controles se va viendo incrementada gradualmente. Mientras que la actividad fosfatasa ácida ligada a membrana empieza a decaer en los controles a partir del tercer día, en el caso de tratamiento con los fenoles liquénicos sigue su

Evolución de la actividad específica del enzima fosfatasa ácida en la fracción soluble de extractos foliares de ramas de Q. rotundifolia incubadas

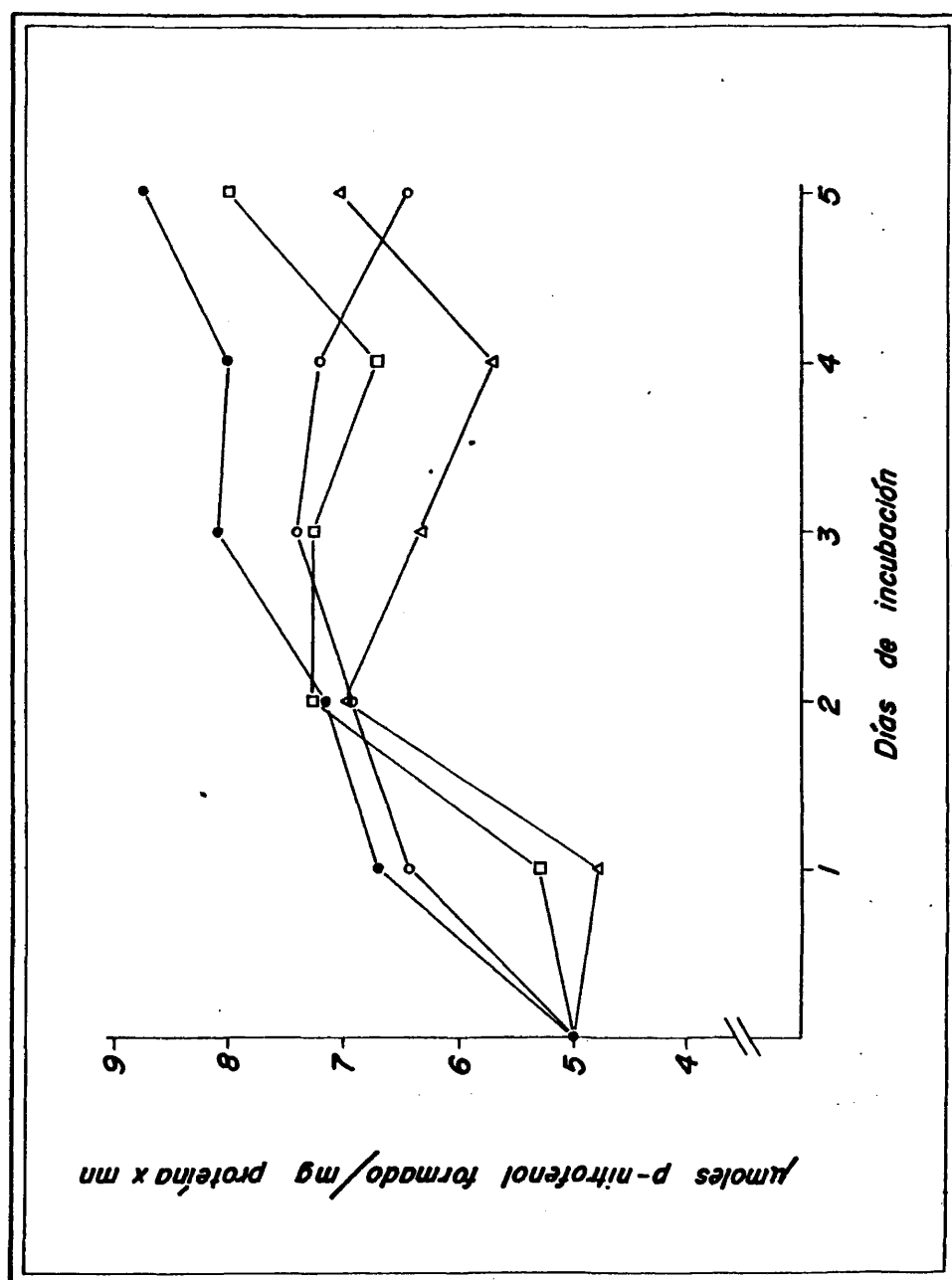
O ——— O en CO_3HNa 1mM
 ● ——— ● en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$)
 Δ ——— Δ en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M
 □ ——— □ en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M



GRAFICA N° 20

Evolución de la actividad específica del enzima fosfatasa ácida ligada a membrana de extractos foliares de ramas de Q. rotundifolia incubadas

O ——— O en CO_3HNa 1mM
 ● ——— ● en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$)
 Δ ——— Δ en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + kinetina 10^{-4}M
 □ ——— □ en CO_3HNa 1mM + sustancias líquénicas (14 $\mu\text{g/ml}$) + ácido giberélico 10^{-4}M



biendo a lo largo de todo el tiempo de experimentación. En esta ocasión ambas hormonas ejercen una eficaz protección por cuanto la actividad específica de extractos obtenidos a partir de esquejes incubados con sustancias liquénicas y hormonas resulta siempre inferior a la de los extractos correspondientes al tratamiento con sustancias liquénicas solamente. Incluso hacen descender los valores por debajo de los controles durante casi todo el tratamiento. Este efecto, que se observa para ambas hormonas, es mucho más notable en el caso de la kinetina que en el del ácido giberélico.

10. ALTERACIONES PROVOCADAS POR LAS SUSTANCIAS LIQUENICAS SOBRE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS CLOROPLASTOS.

El examen detallado de la ultraestructura cloroplástica nos revela que la incubación de esquejes de Q. rotundifolia con las sustancias liquénicas de E. prunastri provoca una notable desorganización de las lamelas tilacoidales de los cloroplastos.

Por una parte, mientras las lamelas de cloroplastos procedentes de esquejes control siguen presentando un aspecto normal al cabo de los días (lámina 21) , los cloroplastos que se han visto sometidos al tratamiento con los fenoles del líquen, frecuentemente aparecen con aspecto desordenado y pérdida o alteración de la estructura de los grana. Este efecto se observa especialmente en la lámina 23 fig. 1 y en la lámina 24 fig. 2. La alteración de las lamelas tilacoidales parece estar relacionada con la aparición de estructuras parecidas a estromacentros (láminas 22, 23 y 24)^{que}, ocupando una importante superficie del cloroplasto, parecen en algunas ocasiones desplazar a las lamelas, que quedan entonces distri-

buidas con una ordenación periférica. Estas estructuras parecen dar lugar a formaciones paracristalinas del tipo que se señala dentro de un círculo en la figura 2 de la lámina 22 y en la figura 1 de la lámina 23. Este tipo de formaciones se resuelven en agrupaciones de hexágonos de alrededor de 10 nm de lado cada uno, ordenados periódicamente. En la lámina 2 de la figura 23 se muestra una magnificación de una de estas formaciones.

Como consecuencia del tratamiento con sustancias líquénicas aparece también en ocasiones una dilatación de las lamelas, que se observa por ejemplo en las figuras nº 1 de las láminas 22 y 23 señalada con flechas.

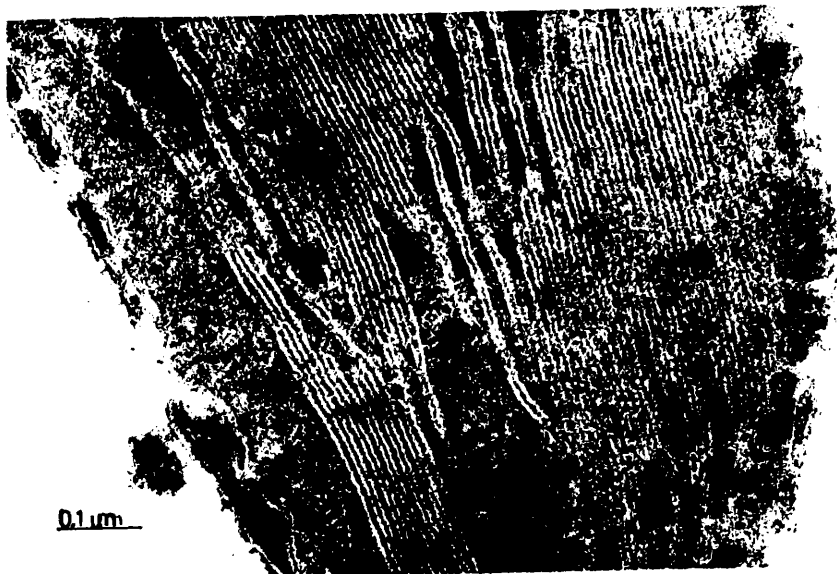
Por último, el tratamiento con los fenoles del líquen coincide también con la aparición, en muchos de los cloroplastos observados, de un número de plastoglobulos muy superior a lo que es normal en cloroplastos de Q. rotundifolia (lámina 22, fig. 2; lámina 24, figuras 1 y 2).

145

LAMINA 21

Cloroplasto correspondiente a una rama control de
Q. rotundifolia no tratada con sustancias liquéní-
cas.

166



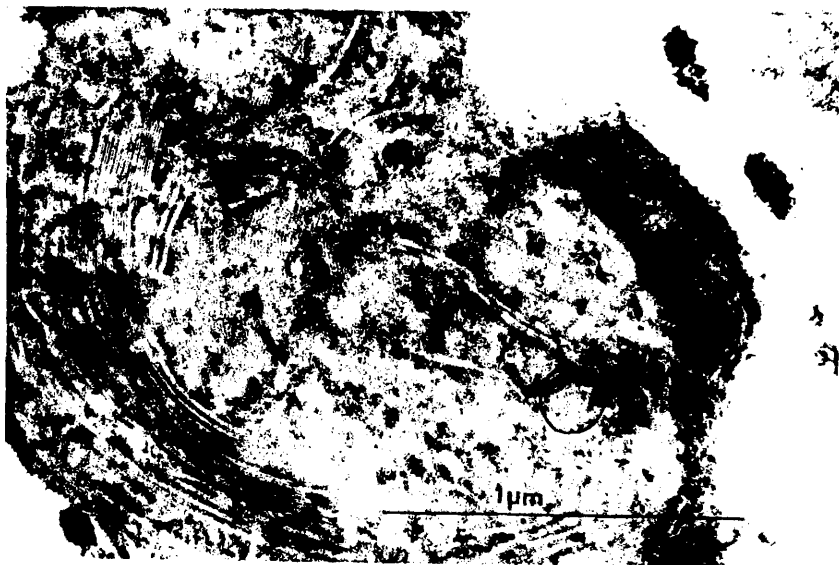
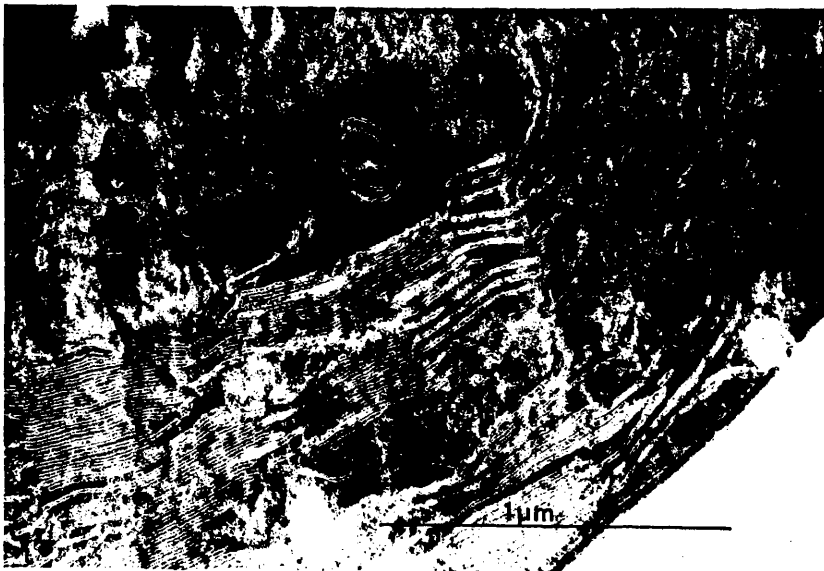
LAMINA 22

Cloroplastos correspondientes a masas de Q. rotundifolia sometidas a tratamiento con sustancias liquénicas.

Fig. 1: Se observa una notable desorganización de las lamelas y de los grana, que tienden a distribuirse en la periferia del cloroplasto. También aparecen muchas lamelas dilatadas, algunas de las cuales se han señalado con flechas.

Fig.2: Aparece también una distribución periférica de las lamelas, con el estroma ocupado por estructuras parecidas a los estromacentros, Se señala con un círculo una formación de aspecto paracristalino.

1/78



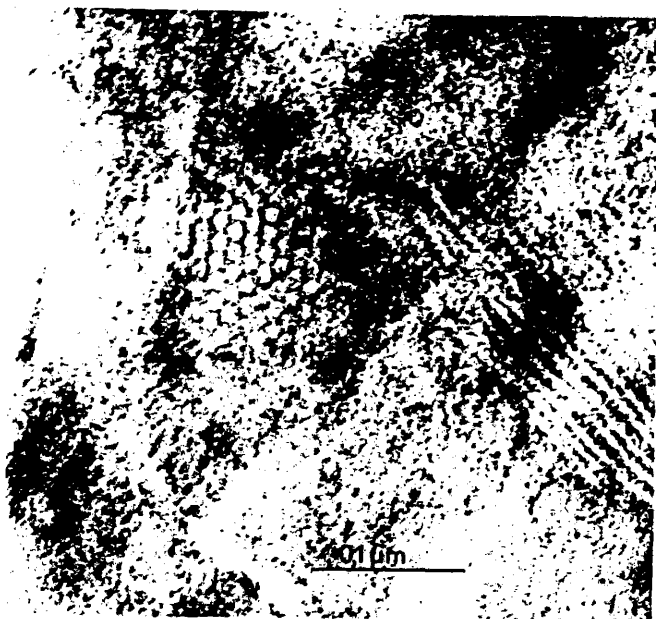
LAMINA 23

Cloroplastos correspondientes a ramas de Q. rotundi-
folia sometidas a tratamiento con sustancias liquén*i*
cas.

Fig. 1: En esta figura se observan varias formacio--
nes paracrystalinas (círculos), disposición pe-
riférica de las lamelas y algunas lamelas dila-
tadas (flechas).

Fig. 2: Ampliación de una formación paracrystalina.

150



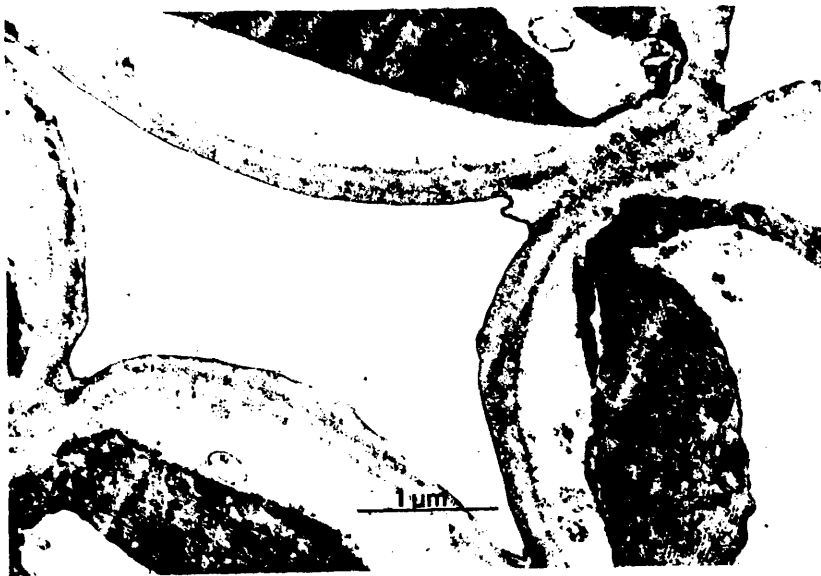
LAMINA 24

Cloroplasto correspondiente a ramas de Q. rotundifolia sometidas a tratamiento con sustancias liquénicas.

Fig. 1 : Vista de conjunto de varias células con plastoglóbulos en el interior de los cloroplastos.

Fig. 2 : Cloroplastos altamente desorganizado con gran cantidad de estructuras con aspecto de estromacentros, formacionesparacristalinas (círculo) y plastoglóbulos.

152



172 m.

IV. DISCUSSION

Distintos autores se han preocupado desde tiempo atrás del problema de la relación existente entre líquenes epífitos y sus forófitos, pero generalmente los trabajos se han enfocado hacia aspectos muy concretos de esta relación, faltando un estudio en profundidad capaz de dar una visión de conjunto del tema.

A pesar de que el conocimiento popular admite el efecto nocivo de los líquenes sobre árboles superiores, faltan estudios directos realizados en campo de la incidencia real de las poblaciones líquénicas sobre el desarrollo de las comunidades vegetales superiores. Sobre este particular BROWN & MIKOLA (1974) apuntan que la presencia del líquen Cladonia alpestris sobre suelos de bosques finlandeses supone una disminución en la tasa de crecimiento de los pinos, que es seis veces inferior a la de pinos próximos que crecen sobre suelo desnudo, relacionando este hecho con la inhibición del crecimiento de micorrizas provocada por los ácidos úsnico y perlatórico excretados por el líquen. ASAHINA & KUOKAWA (1952) señalaban también que la presencia de comunidades líquénicas epifíticas afectaba al desarrollo de los vástagos de plantas de té, aunque estos autores pensaban que podría ser debido a la competencia por la luz. De nuestras observaciones en el encinar de Cedillo de la Torre se deduce que la instalación de poblaciones líquénicas es capaz de provocar la desfoliación de ramas enteras y de arbustos jóvenes (tabla nº1). Aunque no se pueda descartar que algunas ramas muertas cubiertas de líquenes lo estuvieran ya antes de la instalación de los epífitos, en modo alguno se puede pensar que sea éste el caso general ni que los líquenes prosperen precisamente en ramas decadentes. En las láminas 1 y 2 se indica cómo un arbusto y ramas bastante jóvenes han sido dramá

ticamente afectados por los líquenes. Además existen distintos grados de desfoliación que, en líneas generales, se pueden relacionar con la densidad de la población epifítica y con su distribución.

Como se puede comprobar en la tabla n°1, el decaimiento de las ramas afectadas es progresivo y se detecta no sólo en el número de hojas sino también en el de subramificaciones, y este segundo efecto se acentúa al descender en el rango de la subramificación. El resultado final es la atrofia de la rama que, por un parte, ve acelerada la pérdida de sus hojas y, por otra, va perdiendo capacidad de emitir nuevos brotes.

De acuerdo con nuestro punto de vista esta situación se debe a la inyección por parte de los epifitos de sustancias líquénicas en los tejidos vasculares del forofito. De hecho, el efecto alelopático sobre vegetales superiores de estos compuestos fenólicos ha sido repetidamente demostrado en condiciones de laboratorio a nivel de germinación y desarrollo de plántulas de distintas especies vasculares (FOLLMAN & NAKAGAWA, 1963) (FOLLMAN & PETERS, - 1966) (RONDON, 1966) (MILLER, 1966) (PYATT, 1970) (RAMAUT & THONAR, 1971 a & b) (DAURIAC & RONDON, 1976) aunque sin llegar a definir su mecanismo de interferencia.

Nuestra hipótesis se basa en el estudio de la penetración de las hifas líquénicas en el forofito, en el que se demuestra su llegada a los tejidos conductores del huesped, lo cual explicaría algunas de las situaciones anotadas en el campo. Por ejemplo, el que los líquenes no parezcan afectar a una rama cuando su crecimiento se limita a las zonas de mayor diámetro y el que no siempre exista una relación directa entre la densidad de la cobertura líquénica y el grado de desfoliación, podría muy bien ser de

bido a la distinta proporción de talos líquénicos cuya penetración haya prosperado hasta alcanzar los vasos conductores del forofito.

El mecanismo y alcance de la penetración de los líquenes epífitos en el interior del sustrato ha sido un tema muy controvertido desde los primeros estudios al respecto, que se remontan al siglo pasado. En general se pensaba que el desarrollo de las hifas quedaba limitado a los tejidos muertos exteriores de la peridermis, que se trataba de una penetración pasiva a través de heridas del tejido y que no eran en absoluto capaces de penetrar en el interior de células vegetales. Sin embargo, también algunos autores describieron extensa penetración a través de los tejidos corticales, pasando por el floema y alcanzando incluso el cambium (Porter, 1917). En desacuerdo con la antigua teoría y llegando más lejos que PORTER, en nuestro trabajo se demuestra que el líquen Evernia prunastri penetra activamente a través de los distintos tejidos corticales, desgarrándolos sin aparente dificultad, sin que ni siquiera la presencia de grupos de esclereidas suponga un obstáculo a su avance (lámina nº3). Sin embargo, así como en ramas muertas ESTEVEZ y cols. (1980) encontraban masas de hifas invadiendo el xilema y provocando un gran destrozo en este tejido, cuando se trata de ramas del árbol que aún conservan vitalidad, las masas de hifas no son capaces de progresar hacia el interior del tejido, teniendo entonces lugar la penetración a nivel de hifas que, aisladamente o en pequeños grupos, se dispersan progresando en vasos, fibras, radios medulares etc., llegando en ocasiones hasta las mismas células de la médula. Esta situación, que ha sido constatada tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica de transmisión y de scanning, queda patentemente ilustrada en las láminas 4 a la 16, y concuerda con las observaciones ultraestructurales realizadas por ASCASO y cols. (1980) para

Quercus pyrenaica. Además, las dos figuras de la lámina 16 demuestran claramente la capacidad de las hifas liquénicas aisladas de perforar paredes celulares del huesped, situación ésta sobre la que existían muchas dudas por no haber sido fotografiada con anterioridad.

Los resultados del estudio microscópico nos brindan la base estructural para poder hablar de interacción química entre los metabolitos del líquen y los procesos fisiológicos del forofito, puesto que la presencia de las hifas en los tejidos conductores supone una fácil vía de acceso de las sustancias liquénicas a los distintos órganos del huesped.

Siendo el micobionte el componente que acapara un mayor tanto por ciento de materia viva dentro de la simbiosis liquénica, el único responsable de la penetración en los tejidos del huesped y perteneciendo a la clase fúngica, sería de esperar que, de alguna manera, poseyera mecanismos similares a los de estos organismos. La capacidad de los hongos para parasitar plantas superiores depende en primer término de la producción de enzimas capaces de romper los distintos polímeros que forman las paredes celulares de sus huéspedes (BATEMAN, 1976). En este trabajo ha quedado demostrado que E. prunastri posee los mecanismos enzimáticos necesarios para degradar al menos uno de los principales polímeros de paredes celulares de vegetales superiores: la celulosa. Es muy significativo el hecho de que se trate de un enzima cuya actividad aumenta considerablemente ante la presencia del polímero (gráficas 1 y 2) y también el que sea excretable (gráficas 3 y 4), puesto que ésta es precisamente la forma en que generalmente actúan los patógenos de plantas superiores (ENGLISH y cols., 1971). El que el enzima β 1,4 glucanasa, localizada con bajos niveles de actividad en talos incubados en ausencia de CM-celulosa, no sea excretable al medio de incu-

bación nos da idea de que su sentido funcional es completamente diferente.

Es muy probable que los productos de reacción acumulados puedan regular la actividad enzimática. Esto explicaría el que en luz, cuando a los azúcares liberados del polímero por la celulosa se añaden los que se obtienen por fotosíntesis, el máximo de actividad descienda antes que en oscuridad. El mantenimiento de niveles altos de actividad en talos incubados en oscuridad puede significar, para el líquen, un suministro de los nutrientes que en luz consigue por fotosíntesis. Efectivamente, un mecanismo de regulación de este tipo concuerda con la temprana desaparición de la actividad de los medios de incubación de talos mantenidos en oscuridad y con la evolución de la cantidad de celulosa en los mismos. En estas condiciones el mantenimiento del enzima en el interior del talo reportaría un indudable beneficio al líquen.

Una vez establecida una vía a través de la cual los compuestos del líquen tienen la posibilidad de interaccionar con el metabolismo foliar, el siguiente punto a discutir es la existencia de interferencia entre las sustancias líquénicas de E. prunastri y Q. rotundifolia y qué mecanismos intervienen. Habida cuenta del papel regulador de procesos metabólicos dependientes de cationes inorgánicos que estos compuestos parecen ejercer dentro del líquen, que ha sido demostrado para la cloroatranorina a distintos niveles (VICENTE y cols., 1975) (ESTEVEZ & VICENTE, 1976) (VICENTE & ESTEVEZ, 1976), es lógico pensar en una acción similar sobre el huésped.

En los ensayos realizados con cloroplastos aislados de hojas de ramas de Q. rotundifolia durante este trabajo, ha quedado demostrado que las sustancias líquénicas de E. prunastri provocan una

fuerte inhibición de la capacidad fotolítica de estos orgánulos, precisamente por quelación del manganeso cloroplástico, esencial para el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico fotosintética (gráficas 6 y 7). Estos resultados están de acuerdo con el papel regulador de la actividad fotolítica del ficobionte de E. prunastri por parte de la cloroatranorina puesto de relieve por VICENTE y ESTEVEZ (1976).

Resulta evidente que la pérdida de actividad es debida a la quelación del manganeso por parte de las sustancias liquénicas, puesto que la adición del ion a los cloroplastos procedentes de ramas tratadas con estos fenoles restaura su capacidad fotolítica. Además, en estos cloroplastos tiene lugar un descenso gradual en los niveles de manganeso en comparación con los niveles que se detectan en los cloroplastos control (gráfica nº9).

Las cuatro sustancias liquénicas presentes en E. prunastri, ácido evérnico, ácido úsnico, atranorina y cloroatranorina, ejercen un efecto inhibitor del transporte de electrones fotosintético ligado al fotosistema II (histograma nº1, tabla 1), que es más acusado para el ácido úsnico. Este mayor efecto podría explicarse por la presencia en la molécula del ácido úsnico de tres puntos de quelación, frente a los dos que poseen las moléculas de las otras tres sustancias.

A la vista de la inhibición provocada por las sustancias liquénicas a nivel de fotoísis del agua, cabe esperar que la reducción en el suministro de ATP y NADPH al estroma suponga un descenso en la producción de fotoasimilados. En efecto, el tratamiento con sustancias liquénicas provoca una disminución de los niveles foliares de azúcares reductores^y totales, aunque el efecto final, observado al ca

bo de los seis días de tratamiento, no es tan drástico como el que tiene lugar sobre la fotólisis del agua (gráficas 10 y 11).

Tanto la kinetina como el ácido giberélico ejercen una cierta protección sobre la concentración de azúcares foliares durante los primeros días de tratamiento, cuando estas hormonas se añaden a los medios de incubación preparados con sustancias liquénicas. Este efecto llega a hacerse nulo en el cuarto día para el caso de los azúcares reductores y en el tercero para el de los azúcares totales.

Desde luego, ninguna de las dos hormonas es capaz de revertir la inhibición provocada por los fenoles del líquen sobre el transporte electrónico ligado al fotosistema II, lo cual es un argumento más, que indirectamente corrobora la relación de dependencia entre la desaparición del manganeso cloroplástico y la pérdida de capacidad fotolítica: si el efecto inhibitor dependiese de una desorganización del cloroplasto provocada por un proceso de senescencia normal, en lugar de depender de la deficiencia de un compuesto estructural, sería esperable una reorganización y reactivación por efecto de las hormonas, de acuerdo con distintos autores como BISWAL y cols. (1976) y NAITO y cols. (1961).

Son sin embargo los datos de contenido en almidón de las hojas los que nos explican el comportamiento de los azúcares: mientras que en las hojas control la cantidad de almidón no desciende significativamente, en las hojas de ramas tratadas con sustancias liquénicas se da una rápida pérdida (gráfica 12), lo que parece indicar que ante la disminución que productos fotosintetizados, la planta responde con una movilización de reservas, razón por la cual se mantienen unos niveles de azúcares libres superiores a los esperables.

Los resultados obtenidos de esta valoración también son capaces de explicar la protección ejercida por las hormonas sobre los niveles de azúcares durante los primeros días de tratamiento: tanto en el caso de la kinetina como en el del ácido giberélico, la cantidad de almidón sufre una drástica reducción ya en el primer día, lo que justifica el mantenimiento de concentraciones de azúcares superiores a los tratamientos con sustancias liquénicas en ausencia de hormonas. Quizás podría relacionarse este efecto con el efecto inductor de la α -amilasa en semillas, muy característico del ácido giberélico pero también presente en la kinetina, aunque esta acción movilizadora de reservas sólo está descrita para semillas.

Evidentemente, la desaparición de reservas hidrocarbonadas tiene que ir acompañada, o bien por una salida de las mismas al medio de incubación o por un incremento en la respiración. De hecho, ambos fenómenos tienen lugar. La salida de azúcares al medio de incubación después de un día de tratamiento es bastante similar en las ramas control y en las tratadas con sustancias liquénicas, pero notablemente superior en los casos de incubación con sustancias liquénicas y hormonas (gráfica 13). Por otra parte, las hojas de ramas incubadas con sustancias liquénicas muestran, desde el principio, una alta actividad respiratoria, que es algo menor cuando las hormonas están presentes en el medio de incubación (gráfica nº14). En líneas generales, la salida de azúcares a los medios de incubación junto con las actividades respiratorias, se pueden corresponder con la evolución de las reservas almidonadas con los distintos tratamientos.

Otro posible destino de las reservas que van siendo con-

sumidas podría haber sido su transformación en lípidos ya que la capacidad adaptativa de algunas plantas ante ciertas situaciones de stress parece estar relacionada con un incremento de su contenido en lípidos (SIKORSKA & KACPERSKA-PALACZ, 1979). Este mecanismo no parece tener lugar en nuestro caso, en el que sólomente se observa un decaimiento en los niveles de lípidos totales, sin diferencias significativas para los distintos tratamientos (gráfica nº15).

Es evidente que una situación de pobreza energética como la que desencadenan las sustancias liquénicas es difícilmente salvable por la planta o las hojas afectadas, de tal manera que cuando llegue al límite, inevitablemente entrará en un proceso de senescencia. El efecto acelerador de la senescencia foliar inducido por el tratamiento con sustancias liquénicas, ha quedado comprobado a distintos niveles en condiciones de laboratorio. Por una parte la pérdida de agua de los tejidos, que suele acompañar al envejecimiento, se ve acelerada, aunque la situación, durante los primeros días, se ve paliada en cierta medida por la presencia de kinetina o de ácido giberélico en el medio de incubación (gráfica 16). El mismo fenómeno ocurre cuando el parámetro medido es el contenido hídrico relativo, que nos da una idea más exacta del estado fisiológico del tejido, relacionando su contenido en agua con su máxima capacidad hídrica (gráfica 17).

La evolución de la actividad fosfatasa ácida nos puede dar también una buena perspectiva de la marcha del envejecimiento, ya que se trata de uno de los enzimas directamente implicados en la recuperación de materiales que tiene lugar antes de la abscisión foliar. En el caso de nuestra experimentación, los resultados de la valoración de este enzima, tanto en su forma soluble como en la li-

gada a membrana, son definitivos. Particularmente en el segundo de los casos (gráfica n°20) el tratamiento con los fenoles liquénicos supone un notable incremento en la actividad específica del enzima. Además, aparece un claro efecto protector por parte de las hormonas; incluso se mantienen los niveles de actividad específica por debajo de los del control. Precisamente la prevención de la formación de los enzimas hidrolíticos básicos que intervienen en los procesos degradativos, es el papel más típico que juegan las citokininas como hormonas protectoras de envejecimiento. Este mismo efecto ha sido descrito también en algunos casos para el ácido giberélico y es evidente que, en Quercus rotundifolia por lo menos, en lo que a la fosfatasa ácida se refiere, es capaz de desempeñar esta función.

En cuanto al proceso de abscisión foliar, está claro que también se ve acelerado por el tratamiento de los esquejes con los fenoles liquénicos, como se aprecia en la gráfica n°18. Y es lógico que así ocurra siendo como es este proceso el último paso dentro de una serie de etapas encadenadas que han comenzado con la quelación del manganeso cloroplástico. También a este nivel aparece un eficaz efecto protector por parte de ambas hormonas ensayadas, que es algo superior en el caso de la kinetina, hormona cuya capacidad para retrasar la abscisión foliar es de sobra conocida.

No ha sido posible seguir a nivel histológico el desarrollo de la abscisión con los distintos tratamientos, debido a la constatación de que la zona de abscisión se forma ya en la ontogenia foliar en Q. rotundifolia, sin que tenga lugar ninguna transformación ni digestión de paredes celulares, como se aprecia en las láminas 17 a la 20. Al parecer, las hojas de este árbol se mantienen en él

incluso mucho tiempo después de haber perdido toda vitalidad y, cuando caen, la ruptura tiene lugar a través de la zona menos consistente del peciolo, por estar formada por células más pequeñas y carente de esclereidas.

El dramático efecto de desorganización cloroplástica que se observa en los tratamientos con sustancias liquénicas, se puede enfocar desde dos puntos de vista: puede ser la deficiencia en manganeso la que directamente provoque la desorganización de la estructura lamelar (TEICHLER-ZALLEN, 1969), situación muy posible ya que este catión juega un importante papel estructural y su falta trae consigo el que los cloroplastos se vuelvan sensibles a la luz, pierdan su estructura y puedan llegar a desintegrarse. La otra posibilidad es que sea la consecuencia de un proceso típico de senescencia.

La mayoría de las alteraciones observadas en los cloroplastos en respuesta al tratamiento con sustancias liquénicas se pueden atribuir a los cambios ultraestructurales descritos en procesos senescentes: desorganización de los grana, dilatación de las lamelas tilacoidales y aumento de plastoglóbulos. Sin embargo, las estructuras con aspecto de estromacentros, que aprecen en este caso con gran frecuencia, no se describen en relación con hojas senescentes, aunque guardan similitud con estructuras que aprecen en ocasiones en plantas sometidas a condiciones de stress (GUNNING & cols, 1968). Las formaciones de tipo paracristalino, que se resuelven en hexágonos ordenados periódicamente, parecen guardar conexión con las estructuras de aspecto de estromacentros y probablemente evolucionen a partir de ellas.

V. CONCLUSIONES

1. Las poblaciones líquénicas integradas en su mayor parte por el líquen Evernia prunastri son capaces de provocar la desfoliación de ramas y la atrofia de arbustos de Quercus rotundifolia al crecer epifíticamente sobre este forofito.
2. El grado de desfoliación parece estar relacionado con la cantidad de talos líquénicos que hayan tenido éxito en su penetración hasta los tejidos conductores y con su proliferación a este nivel.
3. Los talos líquénicos de E. prunastri son capaces de penetrar activamente en el interior de los tejidos del forofito, provocando una gran destrucción de los tejidos corticales, entre los que crece en forma masiva. Su presencia en el xilema está representada por hifas que, aisladamente o en pequeños grupos, proliferan en su interior de elementos conductores, fibras, radios medulares, y que en ocasiones alcanzan la médula.
4. El líquen posee al menos uno de los mecanismos enzimáticos más necesarios a la hora de degradar las paredes celulares del huesped. Se trata de la actividad β -1,4 glucanasa.
5. Se han observado hifas líquénicas aisladas perforando paredes celulares de sus huespedes lo que junto con el punto anterior, hablaría en favor de una ruptura enzimática de las paredes del huesped.
6. Las sustancias líquénicas de E. prunastri son eficaces inhibidoras del transporte de electrones ligado al fotosistema II de los cloroplastos del forofito y su acción a este nivel tiene lugar por quelación del manganeso de las lamelas tilacoidales.

7. De las cuatro sustancias liquénicas de E. prunastri, el ácido úsnico presenta una mayor acción inhibidora, relacionada con la presencia en su molécula de tres puntos de quelación frente a los dos que poseen la atranorina, la cloroatranorina y el ácido evérnico.
8. La inhibición provocada a nivel de la fotólisis del agua - tiene como consecuencia un descenso de la cantidad de azúcares fotosintetizados.
9. La planta reacciona frente a esta situación de escasez de foto asimilados mediante la degradación de sus reservas de almidón. Las hormonas kinetina y ácido giberélico son capaces de actuar a este nivel promoviendo una más rápida movilización de las re servas hidrocarbonadas, lo que se traduce en una aparente pro tección cuando se miden los niveles de azúcares foliares.
10. La desaparición de reservas hidrocarbonadas con los distintos tratamientos coincide con un incremento en la actividad respi- ratoria foliar y una mayor salida de azúcares al medio de in- cubación.
11. Q. rotundifolia no presenta el mecanismo de acumulación de lí- pidos en respuesta a la situación de stress provocada por las sustancias liquénicas.
12. Esta situación carencial, energéticamente considerada, tiene como consecuencia la aceleración de los procesos de senescencia foliar.
13. El tratamiento con sustancias liquénicas provoca una pérdida de agua en los tejidos y una disminución de su contenido hí- drico relativo como consecuencia del proceso senescente que es- tán acelerando.

14. La actividad hidrolizante del enzima fosfatasa ácida se ve incrementada por el tratamiento con sustancias liquénicas, tanto en la fracción soluble como en la ligada a membrana, lo que está relacionado con el estímulo de los procesos degradativos que están provocando.
15. La tendencia a la abscisión de las hojas de Q. rotundifolia tratadas con sustancias liquénicas es superior a la de las que no han sufrido el tratamiento, siendo ésta la consecuencia final esperable del efecto acelerador de envejecimiento que se ha descrito.
16. Las hormonas vegetales kinetina y ácido giberélico presentan un efecto protector de envejecimiento en Q. rotundifolia; este efecto es generalmente superior para la kinetina que para el ácido giberélico.
17. La ultraestructura de los cloroplastos se ve grandemente afectada por el tratamiento con los fenoles liquénicos, situación que puede ser debida indirectamente a la desorganización provocada por la pérdida del manganeso lamelar.

187

VI. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, D.B. & RISSE, P.G. (1971): Some factors influencing the frequency of bark lichens in North Central Oklahoma.- Amer. J. Bot., 58, 752-757.
- ASAHINA, Y. & KUROKAWA, S. (1952): On the harmful effects of epiphytic lichens upon the higher plants.- Misc.Rep.Res.Inst. Nat. Resour.(Tokyo), 25, 83-86.
- ASCASO, C., GONZALEZ, C., VICENTE, C.(1980): Epiphytic Evernia prunastri (L.)Ach.: ultrastructural facts.- Cryptog., Bryol. Lichénol., 1: 43-51.
- ASHFORD, A.E. & JACOBSEN, J.V. (1974): Cytochemical localization of phosphatase in barley aleurone cells: the pathway of gibberellic acid induced enzyme release.- Planta(Berl.),120:81-105.
- BARKMAN, J.J. (1958): "Phytosociology and Ecology of Cryptogamic Epiphytes", Van Gorcum, Assen, Netherlands.
- BARRS, H.D. (1968): Determination of water deficits in plant tissues. En "Water Deficits and Plant Growth" Vol.I, (ed. J.T. Kolzowski), pags. 235-368, New York & London.
- BATEMAN, D.F.(1976):Plant Cell Wall Hydrolysis by Pathogens. En "Biochemical aspects of Plant-Parasite Relationship" (ed.J.Friend &D.R.Threlfall), Academic Press, London, N.Y. & San Francisco.
- BISWALL,U.C.&PRASANNA MOHANTY(1976): Dark stress induced senescence of detached barley leaves:II.Alteration in the absorption characteristics and photochemical activity of the chloroplasts isolated from senescing leaves.-Plant Science Letters,7: 371-379.
- BONNIER, G. (1889): Recherches sur la synthese des lichens.- Ann. Sci. Nat. VII, 9: 1-32.
- BRIGHTMAN, F.H. & SEAWARD, M.R.D. (1977): Lichens of man-made substrates. En "Lichen Ecology" (ed. M.R.D.Seaward), pags. 253-293, Academic Press, London-New York.
- BRODO, I.M. (1968):The lichens of Long Island: A vegetational and

- floristic analysis.- State Mus.Sci.Serv.Bull., 410: 1-330.
- BRODO, I.M. (1973): Substrate Ecology. En "The Lichens"(ed. V. Ahmadjian & M.E. Hale) pags. 401-441. Academic Press, New York & London.
- BROWN, M.T. & MIKOLA, P. (1974): Inhibition of Pinus sylvestris growth by the lichen Cladonia alpestris.- Acta Forest. Fen, 141, 1-7.
- BROWN, D.H. (1976): Mineral uptake by lichens. En "Lichenology: Progress and Problems" (ed. Brown, Hawksworth & Bailey) Vol. 8, pag. 419-439, Academic Press, London, New York & San Francisco.
- BUSTINZA, F. & CABALLERO, A. (1948): Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes.- An. J. Bot. Madrid, 7: 511-548.
- BUSTINZA, F. (1951): On the antibacterial substances from lichens. - Endeavour, 10: 95-99.
- BUTLER, R.D. & SIMON, E.W.: Ultrastructural aspects of senescence in plants. En "Advances in Gerontological Research III (ed. D. Strehler) pags. 73-129, Academic Press, New York & London (1971).
- CONSTANTOPOULOS, G. (1970): Lipid metabolism of manganese deficient algae. I: Effect of manganese deficiency of the greening and the lipid composition of Euglena gracilis Z.- Plant Physiol., 45, 76-80.
- CULBERSON, W.L. (1955): The corticolous communities of lichens and bryophytes in the upland forest of Northern Wisconsin.- Ecol. Monogr., 25: 215-231.
- DAURIAC, H. & RONDON, Y. (1976): Quelques aspects des propriétés

- d'un lichen: le Letharia vulpina (L.) Hue, en biologie végétale expérimentale. I. Action sur la germination du blé et le développement de l'ail.- Bull. Soc. bot. Fr. 123: 235-241.
- DEGELIUS, G. (1964): Biological studies of the epiphytic vegetation on twigs of *Fraxinus excelsior*.- Acta Hort. Gotoburg, 27, 11-55.
- ENGLISH, P.D., JURALE, J.B. & ALBERSHEIM, P. (1971): Host-Pathogen interactions. II. Parameters affecting polysaccharide-degrading enzyme secretion by Colletotrichum lindemuthianum grown in culture.- Plant Physiol., 47, 1-6.
- ESTEVEZ, P., MARTINEZ, M., VICENTE, C. (1977): Fotodestrucción del β -caroteno y protección de la fotooxidación por cloratanorina.- Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 34(1): 309-316.
- ESTEVEZ, M.P. & VICENTE, C. (1976): Inhibición por cloratanorina de la reducción de NADP^+ por ferredoxina de Evernia prunastri.- Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.), 74: 35-38.
- ESTEVEZ, M.P., ORUS, M.I., VICENTE, C. (1980): Estudios morfológicos sobre Evernia prunastri de vida saprofitica.- Cryptog., Bryol. Lichénol., 1: 33-41.
- FABISZEWSKI, J. (1968): Porosty Snieznika kłodzkiego i gór Białskich (Les lichens du Massif Snieznik et des Montagnes Bialskie dans les Sudetes Orientales).- Monogr. Bot. (Warsaw), 26: 1-116.
- FOLLMAN, G. & NAKAGAWA, M. (1963): Keimhemmung von Angiospermensamen durch Flechtenstoffe.- Naturwissenschaften, 50, 696-697.
- FOLLMAN, G. & PETERS, R. (1966): Flechtenstoffe und Bodenbildung.- Z. Naturforsch., 21b: 386-387.

- DE LA FUENTE-BURGUILLO, P. & NICOLAS, G. (1979): Respiratory activity during germination of seeds of Cicer arietinum L. II. Effect of some metabolic inhibitors and mitochondrial activities.- *Revista Española de Fisiología*, 35: 401-408.
- GRAM, K. & JØRGENSEN, E. (1953): An easy, rapid and efficient method of counter-staining plant tissues and hyphae in wood sections by means of fast green or light green and safranin. - *Friesia* IV, 4-5: 262-266.
- GUNNING, B.E.S. , STEER, M.W. & COCHRANE, M.P. (1968) : Occurrence , molecular structure and induced formation of the stromacentre in chloroplast .- *J. Cell. Sci.* , 3: 445 - 456 .
- HALE, M.E. (1955): Phytosociology of corticolous cryptogams in the upland forest of Southern Wisconsin.- *Ecology*, 36, 45-63.
- ISKANDAR, I.K. & SYERS, J.K. (1971): Solubility of lichen compounds in water: Pedogenetic implications.- *Lichenologist*, 5: 45-50.
- KALGUTKAR, R.M. & BIRD, C.D. (1969): Lichens found on Laix lyallii and Pinus albicaulis in Southwestern Alberta, Canada.- *Can. J. Bot.*, 47, 627-648.
- KATES, K. (1972): Lipid extraction procedures. En "Isolation, Analysis and Identification of Lipids" (Ed. T.S. Work & E. Work) pag. 347-353, North Holland P.C. Amsterdam/American Elsevier P.C. N.Y.
- KATES, K. (1972): General Analytical Procedures. En "Isolation, Analysis and Identification of Lipids" (Ed. T.S. Work & E. Work) pag. 354-392, North Holland P.C. Amsterdam/American

- Elselver P.C. N.Y.
- LEBLANC, F. (1962): Hydrométrie des écorces et epiphytisme.- Rev. Can. Biol., 21: 41-45.
- DE LEO, P., SACHER, J.A. (1970): Senescence: Association of synthesis of acid phosphatase with banana ripening.- Plant Physiol., 46, 208-211.
- LINDAU, G. (1904): Die Beziehungen der Flechten zu den Pilzen.- Hedwigia, 43: 195-204.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent.- J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MARGOT, J. (1977): L'épiphyllie des lichens du genre *Strigulla*, est-elle un cas de parasitisme? Quelques observations morphologiques.- The Lichenologist, 9, 1: 51-63.
- MILLER, E.V., GRIFFIN, C.E., SCHAEFERS, T. & GORDON, M. (1965): Two types of growth inhibitors in extracts of *Umbilicaria papulosa*.- Botan. Gaz., 126(2): 100-107.
- MOISEEVA, E.N. (1961): Biochemical properties of lichens and their practical importance (Resumen de W.L. Culberson).- Bryologist, 65, 264(1962).
- NAITO, K., NAGUMO, S. FURUYA, K. & SUZUKI, H. (1981): Effect of Benzyladenine on RNA and protein synthesis in intact bean leaves at various stages of ageing.- Plant Physiol., 52, 343-348.
- NELSON, N. (1944): Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.- J. Biol. Chem., 153: 375-380.
- PETER, C.S. (1947): "Soil and plant analysis", pag. 272-274, Inter

science Publishers Inc., New York.

- POELT, J. & HERTEL, H. (1968): Pachyascus lapponicus nov. gen. et spec., eine bemerkenswerte Flechtengattung unklaren Anschlusses.- Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd., 81 H.6: S 210-216.
- PORTER, L. (1917): On the attachment organs of the common corticolous Ramalinae.- Proc. Roy. Irish Acad., Sect B, 34: 205-211.
- PYATT, F.B. (1967): The inhibitory influence of Peltigera canina on the germination of graminaceous seeds and the subsequent growth of the seedlings.- Bryologist, 70: 326-329.
- RONDON, Y. (1966): Action inhibitrice de l'extrait du Lichen Roccella fucoides (Dicks.) Vain. sur la germination.- Bull. Soc. Bot. Fr., 113, 1-2.
- RONDON, Y. (1968): Les lichens parasites d'autres lichens.- Cahiers des Naturalistes, 32: 39-41.
- REYNOLDS, S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.- J. Cell Biol., 17: 208-212.
- RUNDEL, P.W. (1978): The ecological role of secondary lichen substances.- Biochemical Systematics and Ecology, 6: 157-170.
- SANTESSON, J. (1965): Studies on the chemistry of lichens. 24: Thin layer chromatography of aldehydic aromatic lichen substances. - Acta Chem. Scand., 19: 2254-2256.
- SCHATZ, A. (1963): Soil microorganisms and soil chelation: The pedogenic action of lichens and lichen acids.- J. Agr. Food. Chem., 11(2): 112-118.
- SIKORSKA, E. & KACPERSKA-PALACZ, A. (1979): Phospholipid involvement in frost tolerance.- Physiol. Plant., 47, 144-150.

- SMITH, D.C. (1962): The biology of lichen thalli.- Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 37: 537-570.
- SKARE, N.H., PAUS, F. & RAA, J. (1975): Production of Pectinase and Cellulase by Cladosporium cucumericum with dissolved carbohydrates and isolated cell walls of Cucumber as carbon sources. Physiol. Plant., 33: 229-233.
- SOLBERG, Y. (1979): Studies on the Chemistry of Lichens, XX. The element concentration of the lichen species Alectoria fremontii and its associated bark substrate of Pinus silvestris.- Z. Naturforsch., 34c: 1275-1277.
- SOMOGYI, M. (1945): A new reagent for the determination of sugars. - J. Biol. Chem., 160: 61-68.
- SRIVASTAVA, L.M. (1964): Anatomy, chemistry and physiology of bark.- Int. Rev. Forest. Res., 1: 203-277.
- STRAIN, H.H., COPE, B.T. & SVEC, W.A. (1971): Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. En "Methods in Enzymology (A. San Pietro ed.) 23: 452-476, Academic Press, New York.
- SYERS, J.K. & ISKANDAR, I.K. (1973): Pedogenetic significance of lichens. En "The lichens" (ed. V. Ahmadjian & M.E. Hale) pag. 225-248, Academic Press, London & New York.
- TEICHLER-ZALLEN, D.: The effect of manganese on chloroplast structure and photosynthetic abilities of Chlamydomonas reinhardtii - Plant Physiol., 44: 701-710. (1968).
- TROTET, G. (1969): Recherches sur la nutrition des lichens.- Rev. Bryol. Lichénol., 36: 733-736.
- TUOMINEN, Y. & JAAKKOLA, T. (1973): Absorption and accumulation of mineral elements and radioactive nuclides. En "The Lichens"

(ed. V. Ahmadjian & M.E. Hale) pag. 185-224, Academic Press, London & New York.

VICENTE, C., ESTEVEZ, M.P., GARCIA, F. (1975): Inactivación de catalasa por cloroatranorina.- Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 32(2): 577-583.

VICENTE, C. (1975): "Fisiología de las sustancias líquénicas", a) pag. 1-42, b) pag. 43-70, ed. Alhambra, Madrid.

VICENTE, C. & ESTEVEZ, M.P. (1976): Inhibition of photolysis by chloroatranorine in isolated chloroplasts from Evernia prunastri's phycobiont.- Bol. R. Soc. Española Hist. Nat.(Biol) 74: 17-23.

ZEHETLEINER, G. (1978): Ueber einige parasitische Arten der Flechtengattung Verrucaria.- Nova Hedwigia, 29 /3-4: 683-734.

WRINKLER, W. (1965): "Standard methods for the examination of water, sewage and industrial wastes. Winkler method unmodified, American Public Health Association, New York, pag. 252-255.

